

Vázquez, Ana María

**Caracterización y evaluación de
compuestos orgánicos volátiles presentes
en especies vegetales de las familias
apiaceae, asteraceae, lamiaceae y
verbenaceae por microextracción en fase
sólida del espacio de cabeza y su relación
con la aceptabilidad sensorial de aquellas
de uso alimenticio**

**Tesis para la obtención del título de posgrado de
Doctor en Ciencias Agropecuarias**

Director: Oberti, Juan Carlos María

Documento disponible para su consulta y descarga en **Biblioteca Digital - Producción Académica**, repositorio institucional de la **Universidad Católica de Córdoba**, gestionado por el **Sistema de Bibliotecas de la UCC**.



Esta obra está bajo licencia 2.5 de Creative Commons Argentina.

Atribución-No comercial-Sin obras derivadas 2.5

TÍTULO DE LA TESIS: Caracterización y evaluación de compuestos orgánicos volátiles presentes en especies vegetales de las familias Apiaceae, Asteraceae, Lamiaceae y Verbenaceae por microextracción en fase sólida del espacio de cabeza y su relación con la aceptabilidad sensorial de aquellas de uso alimenticio.

RESUMEN

En el presente trabajo se optimizaron técnicas basadas en microextracción en fase sólida del espacio de cabeza (HS-SPME) en cuanto a tipo de fibra, temperatura de extracción, y tiempos de equilibrado del espacio de cabeza (HS) y de exposición de la fibra en el HS. Con las técnicas optimizadas se caracterizaron las fracciones volátiles de especies y variedades de *Tagetes* (Asteraceae), *Lantana* (Verbenaceae), *Clinopodium* (Lamiaceae), *Origanum* (Lamiaceae) y *Coriandrum sativum* (Apiaceae), las cuales se compararon con la composición de los aceites esenciales obtenidos por hidrodestilación. Además, se realizó una descripción sistemática de los componentes volátiles de las partes aéreas por separado de cada una de las plantas estudiadas. Los datos químicos se combinaron con herramientas estadísticas, lo que permitió la clasificación y agrupamiento de las muestras en función de sus perfiles quimiométricos. Por lo tanto, la HS-SPME resultó sistema analítico sencillo, rápido, selectivo, sensible y libre de solventes no sólo para la caracterización de compuestos volátiles, sino que, adicionalmente, en el caso de orégano, la integración de los datos obtenidos con datos sensoriales y herramientas estadísticas, proporcionó una idea sobre cómo los compuestos volátiles presentes contribuyeron a su aroma y sabor.

Palabras clave: plantas aromáticas, compuestos volátiles, microextracción en fase sólida del espacio de cabeza, análisis sensorial.

ABSTRACT

In this work, techniques based on headspace solid phase microextraction (HS-SPME) were optimized in terms of fiber type, extraction temperature, equilibrium and extraction time of headspace. With the optimized techniques, the volatile fractions of species and varieties of *Tagetes* (Asteraceae), *Lantana* (Verbenaceae), *Clinopodium* (Lamiaceae), *Origanum* (Lamiaceae) and *Coriandrum sativum* (Apiaceae) were characterized, which were compared with the composition of the essential oils obtained by hydrodistillation. In addition, a systematic description of the volatile compounds of different aerial parts of each of the studied plants was performed. The chemical data were combined with statistical tools, which allowed the classification and grouping of the samples according to their chemometric profiles. Therefore, HS-SPME resulted in a simple, fast, selective, sensitive and solvent-free analytical system, not only for the characterization of volatile compounds, but also, in the case of oregano, the integration of data obtained with data sensory and statistical tools, provided insight into how the present volatile compounds contributed to its aroma and taste.

Keywords: aromatic plants, volatile compounds, headspace solid phase microextraction, sensory analysis.



UNIVERSIDAD
CATÓLICA DE CÓRDOBA
Universidad Jesuita

Facultad de Ciencias Agropecuarias

TESIS PARA OPTAR POR EL TÍTULO DE DOCTOR EN CIENCIAS AGROPECUARIAS

**“CARACTERIZACIÓN Y EVALUACIÓN DE COMPUESTOS
ORGÁNICOS VOLÁTILES PRESENTES EN ESPECIES
VEGETALES DE LAS FAMILIAS APIACEAE, ASTERACEAE,
LAMIACEAE Y VERBENACEAE POR MICROEXTRACCIÓN
EN FASE SÓLIDA DEL ESPACIO DE CABEZA Y SU
RELACIÓN CON LA ACEPTABILIDAD SENSORIAL DE
AQUELLAS DE USO ALIMENTICIO.”**

Ana María Vázquez

Año 2018

DIRECTOR: Dr. Juan Carlos María Oberti

CO-DIRECTOR: Dr. Rubén Olmedo

Comité de tesis:

Dra. María Cristina Goldner

Dra. Susana Hang

Dra. Viviana E. Nicotra

Dedicatoria

En nuestras vidas todo funciona o se desarrolla en base a una motivación, un impulso, un motor.... A mi esposo y mi hijo, por ser motores en mi vida.

Somos el producto de aquello que nos viene dado y de nuestras relaciones desde el momento de nuestro nacimiento... A mi madre, porque desde pequeña me enseñó a dar rienda suelta a mi imaginación, a creer en mi misma, a no juzgar a los demás y a apreciar el milagro diario de la vida. A mis hermanos, porque me enseñaron el valor de compartir, sin miedos, sin tapujos, con honestidad, desde el corazón.

Pocas personas quedan grabadas a fuego en el alma de los demás aún después de que se han ido de este mundo... A mi abuela y mi tía, porque me dieron tanto amor que es imposible olvidarlas.

Agradecimientos

Al Dr. Juan Carlos Oberti, por haber confiado en mí, por su invaluable y constante apoyo, por su capacidad científica, y por la paciencia y el cariño con que siempre me guió.

Al Dr. Rubén Olmedo, por su generosidad al aceptar acompañarme y guiarme en este trabajo de tesis, por su humildad, capacidad científica y humana, y por su apoyo y valiosa contribución a mi formación.

A los miembros del tribunal de tesis, Dra. María Cristina Goldner, Dra. Susana Hang y Dra. Viviana Nicotra, por su valiosa contribución a mi formación y por el tiempo dedicado a la evaluación y devolución de esta tesis. Al Dr. Rubén Grosso, miembro de la comisión de seguimiento de tesis, por sus valiosos aportes en las evaluaciones tanto del proyecto como de los informes de avance.

A los Secretarios de Posgrado de la Universidad Católica de Córdoba, anterior, Dr. Alejandro Mingo, y actual, Mg. Graciela Áscar, y a las autoridades de la Facultad de Ciencias Químicas, Mg. Federico Giraudo, Esp. Diego Andrione y Mg. Adriana Welter, por respaldar el otorgamiento de la beca de posgrado UCC, que me permitió llevar a cabo este trabajo de tesis.

A Gustavo Ruiz y Silvia Criado, por sus valiosos aportes sobre botánica, y por el registro de las muestras en el Herbario Marcelino Sayago de la Universidad Católica de Córdoba.

A la Dra. Marta Goleniowski por su preciada colaboración en el desarrollo de los cultivos in vitro de *Clinopodium odorum*.

Al Ing. Agr. Javier Robert, por la generosa contribución respecto a las semillas de coriandro e información relacionada con sus cultivos.

A mis compañeras del equipo de investigación, Florencia Decarlini y Gabriela Demmel, por estar siempre bien predispuestas a enfrentar juntas los desafíos constantes que devienen de tratar de seguir “haciendo ciencia” con bajo presupuesto.

A mis compañeros de trabajo, por estar ahí, siempre brindándome su apoyo incondicional, y, a veces, sólo compartiendo buenos momentos, unos mates, un café o un almuerzo: Adriana Welter, Celia González, Noelia Montoya, Mariángeles Díaz Panero, Elena Nores, Diego Andrione, Mariano Zaragoza, Alberto Bertoni, Esteban Delsanto, Pamela Aguirre, Néstor Soria y Pablo Yang.

Y mi especial agradecimiento a Leandro y Nicolás, mis amores, quienes me acompañaron en este proceso con cariño y paciencia, y me alentaron y apoyaron siempre; y a mi madre, por haber sembrado en mí, desde la infancia, la curiosidad y la actitud permanente para aprender, y por mostrarme el valor del conocimiento para acercarnos a la verdad y la libertad.

Índice General

	Pág.
Introducción	1
1º PARTE: MARCO TEÓRICO	4
Capítulo 1: Los componentes volátiles responsables del aroma de las plantas	5
1.1- Funciones de los compuestos volátiles vegetales	6
1.1.1- Rol de los componentes volátiles en los procesos de reproducción vegetal	7
1.1.2- Rol de los componentes volátiles en mecanismos de defensa vegetal	8
1.1.3- Rol de los componentes volátiles en las interacciones tritróficas	10
1.1.4- Rol de los componentes volátiles en las interacciones con otras plantas ..	10
1.1.5- Rol de los compuestos volátiles en procesos de estrés abiótico	12
1.2- Biosíntesis de los compuestos volátiles vegetales	16
1.2.1- Biosíntesis de terpenoides	17
1.2.2- Biosíntesis de compuestos bencenoides y fenilpropanoides	21
1.2.3- Biosíntesis de compuestos volátiles derivados de ácidos grasos	24
1.2.4- Biosíntesis de compuestos volátiles derivados de aminoácidos de cadena ramificada	26
1.3- Emisión de volátiles desde los vegetales a la atmósfera	28
1.3.1- Modelos de emisión basados en la difusión	30
1.3.2- Modelos de emisión que involucran mecanismos biológicos	30
1.4- Regulación de la emisión de compuestos volátiles vegetales	33
Capítulo 2: Técnicas de análisis de compuestos volátiles vegetales	36
2.1- Técnicas de análisis de reservorios de compuestos volátiles vegetales	37
2.1.1- Técnicas tradicionales	37
2.1.1.1- Hidrodestilación	37
2.1.1.2- Destilación por arrastre con vapor de agua	39
2.1.1.3- Extracción con solventes orgánicos	40
2.1.1.4- Extracción combinada con destilación	41
2.1.2- Técnicas de desarrollo más reciente	42
2.1.2.1- Uso de las microondas	43
2.1.2.2- Extracción con fluidos en estado supercrítico	45
2.1.2.3- Extracción con agua subcrítica	47
2.1.2.4- Extracción con solventes a alta presión	48
2.1.2.5- Extracción asistida por ultrasonidos	49
2.1.2.6- Extracción por sorción en barra de agitación extractiva	51
2.2- Técnicas de captura de compuestos volátiles vegetales	54

	Pág.
2.2.1- Análisis del espacio de cabeza dinámico	55
2.2.1.1- Purga y trampa	56
2.2.1.2- Arrastre en circuito cerrado	57
2.2.1.3- Sistemas de extracción y de extracción y empuje	58
2.2.2- Análisis del espacio de cabeza estático	59
2.2.2.1- Microextracción en fase líquida del espacio de cabeza	61
2.2.2.2- Microextracción en fase sólida del espacio de cabeza	63
2.3- Separación, identificación y cuantificación de compuestos volátiles por cromatografía de gases	65
2.4- Similitudes y discrepancias entre compuestos volátiles almacenados y emitidos	68
2.4.1- Factores que dependen de la técnica	68
2.4.2- Factores que dependen de las propiedades físico-químicas de las plantas	69
2.4.3- Factores biológicos	70
2.4.4- Factores de estrés bióticos y abióticos	71
Capítulo 3: Análisis de compuestos volátiles por Microextracción en Fase Sólida del Espacio de Cabeza (HS-SPME).....	73
3.1- Análisis del espacio de cabeza	74
3.1.1- Factores que afectan la concentración de analitos en el espacio de cabeza.....	79
3.1.1.1- Influencia de la temperatura sobre la concentración de volátiles en el espacio de cabeza	79
3.1.1.2- Influencia del volumen de muestra sobre la concentración de analitos en el espacio de cabeza	83
3.1.1.3- Influencia de la matriz de la muestra por variación del coeficiente de actividad sobre la concentración de analitos en el espacio de cabeza	85
3.1.2- Equilibrado del espacio de cabeza	86
3.2- Microextracción en fase sólida del espacio de cabeza	87
3.2.1- Teoría de la microextracción en fase sólida	87
3.2.1.1- Factores que afectan la microextracción en fase sólida	92
3.2.1.1.1- Volumen de la fase extractante	92
3.2.1.1.2- Coeficiente de partición del analito entre la fase extractante y la muestra	93
3.2.1.1.3- Matriz de la muestra	95
3.2.1.2- Cinética de la microextracción en fase sólida	97
3.2.1.3- Tipos de recubrimientos de las fibras de microextracción en fase sólida	100

	Pág.
3.2.1.4- Desorción de analitos extraídos	103
3.2.2- Aspectos metodológicos de la microextracción en fase sólida del espacio de cabeza	104
3.2.2.1- Viales para la muestra	104
3.2.2.2- Fibras comerciales de microextracción en fase sólida	105
3.2.2.2.1- Fases líquidas	107
3.2.2.2.2- Fases adsorbentes	108
3.2.2.3- Procedimiento general de análisis	113
3.2.2.4- Optimización del proceso de muestreo	113
3.2.2.3.1- Selección del tipo de fibra	114
3.2.2.3.2- Selección de la temperatura de trabajo	116
3.2.2.3.3- Selección de tiempos de equilibrado del espacio de cabeza y de extracción	117
3.2.3- Aplicaciones de la microextracción en fase sólida del espacio de cabeza	118
Capítulo 4: Análisis sensorial de alimentos	120
4.1- Generalidades del análisis sensorial	121
4.2- Mecanismo de la percepción sensorial	123
4.2.1- Las propiedades organolépticas y los sentidos del ser humano	123
4.2.1.1- El sentido del gusto	124
4.2.1.2- El sentido del olfato	125
4.2.1.3- El sentido de la vista	127
4.2.1.4- El sentido del tacto	127
4.2.1.5- El sentido del oído	128
4.2.1.6- Flavor	129
4.3- Tipos de pruebas sensoriales	130
4.3.1- Pruebas sensoriales analíticas	130
4.3.2- Pruebas sensoriales afectivas	131
4.3.2.1- Pruebas de preferencia	131
4.3.2.2- Pruebas de aceptabilidad	131
4.4- Jueces	132
4.4.1- Jueces analíticos	133
4.4.1.1- Jueces expertos	133
4.4.1.2- Jueces entrenados	133
4.4.1.3- Jueces semientrenados o de laboratorio	134
4.4.2- Jueces afectivos o consumidores	134
4.5- Presentación de las muestras en las pruebas sensoriales	135
4.6- Procesamiento de datos a partir de pruebas de aceptabilidad sensorial	136

	Pág.
2º PARTE: MATERIALES Y MÉTODOS	138
Capítulo 5: Materiales y metodologías utilizados	139
5.1- Optimización de la técnica de HS-SPME	139
5.1.1- Muestras	139
5.1.2- Variables de optimización del muestreo por HS-SPME y análisis estadísticos	140
5.1.3- Sistemas cromatográficos	141
5.1.3.1- Cromatógrafo Gas-FID	141
5.1.3.2- Cromatógrafo Gas-Masa	141
5.2- Estudios de caracterización de compuestos volátiles vegetales	142
5.2.1- Muestras	142
5.2.2- Obtención y análisis de los aceites esenciales	144
5.2.3- Estudio de la composición de volátiles por HS-SPME	144
5.2.4- Micropropagación de plantas de <i>C. odorum</i> y medios de cultivo	144
5.2.5- Estudio de estabilidad de semillas de <i>C. sativum</i>	147
5.2.6- Estudio de la composición de volátiles en semillas de coriandro producida en años diferentes	147
5.2.7- Análisis estadísticos	149
5.3- Estudios de evaluación sensorial de muestras de orégano	150
5.3.1- Muestras	150
5.3.2- Metodología para el análisis sensorial de orégano criollo y chileno II	151
5.3.3- Metodología para el análisis sensorial de muestras comerciales de orégano	153
5.3.4- Análisis estadísticos	154
3º PARTE: RESULTADOS Y DISCUSIÓN	155
Capítulo 6: Caracterización de compuestos volátiles en especies del género <i>Tagetes</i> (Asteraceae)	156
6.1- Introducción	156
6.2- Optimización del muestreo por HS-SPME	159
6.2.1- Selección del tipo de fibra SPME	159
6.2.2- Selección de la temperatura de trabajo	161
6.2.3- Selección del tiempo de equilibrado del HS	162
6.2.4- Selección del tiempo de exposición de la fibra en el HS	162
6.3- Caracterización de compuestos volátiles en <i>Tagetes minuta</i>	164
6.3.1- Comparación entre el análisis por HS-SPME y del aceite esencial	166
6.3.2- Diferencias entre la composición de inflorescencias, tallos y hojas	167
6.4- Caracterización de compuestos volátiles en <i>Tagetes filifolia</i>	168

	Pág.
6.4.1- Comparación entre el análisis por HS-SPME y del aceite esencial	169
6.4.2- Diferencias entre la composición de inflorescencias, tallos y hojas	170
6.5- Caracterización de compuestos volátiles en <i>Tagetes argentina</i>	171
6.5.1- Comparación entre el análisis por HS-SPME y del aceite esencial	173
6.5.2- Diferencias entre la composición de inflorescencias, tallos y hojas	173
6.6- Comparación de la composición de volátiles en las tres especies de <i>Tagetes</i>	174
Capítulo 7: Caracterización de compuestos volátiles en especies del género <i>Lantana</i> (Verbenaceae)	175
7.1- Introducción	175
7.2- Optimización del muestreo por HS-SPME	181
7.2.1- Selección del tipo de fibra SPME	181
7.2.2- Selección de la temperatura de trabajo	182
7.2.3- Selección del tiempo de equilibrado del HS	183
7.2.4- Selección del tiempo de exposición de la fibra en el HS	184
7.3- Caracterización de compuestos volátiles en <i>Lantana balansae</i>	186
7.3.1- Comparación entre el análisis por HS-SPME y del aceite esencial	188
7.3.2- Diferencias entre la composición de inflorescencias, tallos y hojas	189
7.4- Caracterización de compuestos volátiles en <i>Lantana grisebachii</i>	190
7.4.1- Comparación entre el análisis por HS-SPME y del aceite esencial	192
7.4.2- Diferencias entre la composición de inflorescencias, tallos y hojas	193
7.5- Caracterización de compuestos volátiles en <i>Lantana camara</i> provenientes de especímenes con flores de colores diferentes	194
7.5.1- <i>L. camara</i> de flores de color rosa y amarillo	194
7.5.1.1- Comparación entre el análisis por HS-SPME y del aceite esencial	194
7.5.1.2- Diferencias entre la composición de inflorescencias, tallos y hojas	201
7.5.2- <i>L. camara</i> de flores de color naranja y amarillo	202
7.5.2.1- Comparación entre el análisis por HS-SPME y del aceite esencial	202
7.5.2.2- Diferencias entre la composición de inflorescencias, tallos y hojas	203
7.5.3- <i>L. camara</i> de flores de color amarillo	204
7.5.3.1- Comparación entre el análisis por HS-SPME y del aceite esencial	204
7.5.3.2- Diferencias entre la composición de inflorescencias, tallos y hojas	205
7.5.4- <i>L. camara</i> de flores de color blanco	206
7.5.4.1- Comparación entre el análisis por HS-SPME y del aceite esencial	206
7.5.4.2- Diferencias entre la composición de inflorescencias, tallos y hojas	207
7.6- Comparación de la composición de volátiles en las especies de <i>Lantana</i> estudiadas	210

	Pág.
Capítulo 8: Caracterización de compuestos volátiles en semillas de <i>Coriandrum sativum</i> (Apiaceae). Estudio de la variación de la composición de volátiles en función del año de cosecha y del tiempo de almacenamiento	214
8.1- Introducción	214
8.2- Optimización del muestreo por HS-SPME	220
8.2.1- Selección del tipo de fibra SPME	220
8.2.2- Selección de la temperatura de trabajo	220
8.2.3- Selección del tiempo de equilibrado del HS	221
8.2.4- Selección del tiempo de exposición de la fibra en el HS	222
8.3- Caracterización de compuestos volátiles en semillas de <i>Coriandrum sativum</i>	223
8.3.1- Comparación entre el análisis por HS-SPME y del aceite esencial	225
8.3.2- Estudio del cambio en la composición de volátiles de <i>C. sativum</i> durante el almacenamiento	227
8.3.2.1- Estudio de los cambios en la composición de volátiles de semillas de coriandro en polvo durante el almacenamiento	228
8.3.2.2- Estudio de los cambios en la composición de volátiles de semillas de coriandro enteras durante el almacenamiento	230
8.3.3- Estudio de la composición de volátiles en <i>C. sativum</i> obtenidas en diferentes años de producción	232
Capítulo 9: Caracterización de compuestos volátiles en especies del género <i>Clinopodium</i> (Lamiaceae). Estudio comparativo entre <i>C. odorum</i> silvestre y plantas cultivadas in vitro	239
9.1- Introducción	239
9.2- Optimización del muestreo por HS-SPME	242
9.2.1- Selección del tipo de fibra SPME	242
9.2.3- Selección de la temperatura de trabajo	243
9.2.4- Selección del tiempo de equilibrado del HS	244
9.2.5- Selección del tiempo de exposición de la fibra en el HS	245
9.3- Caracterización de compuestos volátiles en <i>Clinopodium odorum</i>	247
9.3.1- Comparación entre el análisis por HS-SPME y del aceite esencial	249
9.3.2- Diferencias entre la composición de inflorescencias, tallos y hojas	252
9.4- Caracterización de compuestos volátiles en <i>Clinopodium gilliesii</i>	253
9.4.1- Comparación entre el análisis por HS-SPME y del aceite esencial	255
9.4.2- Diferencias entre la composición de inflorescencias, tallos y hojas	256
9.5- Comparación de la composición de volátiles en las dos especies de <i>Clinopodium</i>	257

	Pág.
9.6- Aplicación de la metodología de HS-SPME desarrollada para la comparación de la composición de volátiles en <i>C. odorum</i> silvestre y plantas micropropagadas in vitro de la misma especie	258
Capítulo 10: Estudio de caracterización de compuestos volátiles en especies del género <i>Origanum</i> (Lamiaceae), de aceptabilidad sensorial y correlación químico-sensorial	265
10.1- Introducción	265
10.2- Optimización del muestreo por HS-SPME	269
10.2.1- Selección del tipo de fibra SPME	269
10.2.2- Selección de la temperatura de trabajo	270
10.2.3- Selección del tiempo de equilibrado del HS y de exposición de la fibra	272
10.3- Caracterización de compuestos volátiles en diferentes tipos de orégano cultivado en Córdoba, Argentina	274
10.3.1- Caracterización de compuestos volátiles en <i>Origanum x majoricum</i> Cambessedes	278
10.3.1.1- Comparación entre el análisis por HS-SPME y del aceite esencial	278
10.3.1.2- Diferencias entre la composición de inflorescencias y hojas	280
10.3.2- Caracterización de compuestos volátiles en “orégano compacto”	281
10.3.2.1- Comparación entre el análisis por HS-SPME y del aceite esencial	281
10.3.2.2- Diferencias entre la composición de inflorescencias y hojas	282
10.3.3- Caracterización de compuestos volátiles en “orégano criollo”	283
10.3.4- Caracterización de compuestos volátiles en “orégano chileno II”	284
10.4- Caracterización de compuestos volátiles en muestras comerciales de orégano	285
10.5- Análisis sensorial de las muestras orégano	291
10.6- Correlación entre datos químicos y sensoriales de las muestras de orégano comercial	296
4º PARTE: CONCLUSIONES	302
Capítulo 11: Conclusiones finales	303
Anexo: Publicaciones derivadas del trabajo de tesis	307
Bibliografía	310

Índice de Tablas

	Pág.
Capítulo 1	
1.1 Funciones biológicas de algunos compuestos orgánicos volátiles vegetales	14
1.2 Ejemplos de estructuras representativas de compuestos volátiles vegetales por grupos químicos de las diferentes rutas biosintéticas	27
Capítulo 3	
3.1 Efecto del cambio de volumen de muestra sobre la concentración de analitos en el espacio de cabeza manteniendo constante el volumen del vial	84
3.2 Tipos de revestimientos de las fibras para SPME comercialmente disponibles	106
Capítulo 5	
5.1 Especies vegetales sobre las que se optimizaron las condiciones analíticas para HS-SPME	140
5.2 Condiciones de trabajo de los cromatógrafos de gases utilizadas en los análisis ...	142
5.3 Especies vegetales estudiadas	143
5.4 Composición química de los diferentes medios de crecimiento	146
5.5 Características de los medios de crecimiento in vitro usados en este estudio	147
5.6 Fechas de siembra, cosecha de los lotes de coriandro. Cañada de Luque, Córdoba, años 2010, 2011 y 2012	149
5.7 Números aleatorios asignados a las muestras de orégano analizadas	150
5.8 Categorización de la escala hedónica de 9 puntos para el análisis de aceptabilidad de las muestras de orégano	151
Capítulo 6	
6.1 Resultados del ANOVA sobre los datos de optimización de las condiciones experimentales para el análisis de CVV en especies del género <i>Tagetes spp</i>	164
6.2 Componentes volátiles hallados en <i>T. minuta</i> L. por análisis del aceite esencial y HS-SPME	165
6.3 Componentes volátiles hallados en <i>T. filifolia</i> Lag. por HS-SPME	168
6.4 Componentes volátiles hallados en <i>T. argentina</i> Cabrera por HS-SPME	171
Capítulo 7	
7.1 Optimización de las condiciones experimentales para el análisis de especies del género <i>Lantana spp</i>	185
7.2 Componentes volátiles hallados en <i>L. balansae</i> por análisis del aceite esencial y HS-SPME	186
7.3 Componentes volátiles hallados en <i>L. grisebachii</i> por análisis del aceite esencial y HS-SPME	190

	Pág.
Capítulo 8	
8.1 Optimización de las condiciones experimentales para el análisis de semillas de <i>C. sativum</i>	223
8.2 Componentes volátiles hallados en <i>C. sativum</i> por análisis del aceite esencial y HS-SPME	224
8.3 Efecto del almacenamiento sobre la composición de volátiles polvo de semillas de <i>C. sativum</i> por HS-SPME	2229
8.4 Efecto del almacenamiento en silobolsa sobre la composición de volátiles de semillas enteras de <i>C. sativum</i> por HS-SPME	231
8.5 Registro meteorológico de Córdoba durante los meses de cultivo de <i>C. sativum</i> en los años estudiados	233
8.6 Rendimiento y composición de volátiles de semillas de <i>C. sativum</i> producido en Cañada de Luque, Córdoba, Argentina, años 2010, 2011 y 2012	235
8.7 Correlación de Pearson ($\alpha=0,05$) entre los resultados obtenidos y los factores meteorológicos de los años de cultivo de <i>C. sativum</i>	237
Capítulo 9	
9.1 Optimización de las condiciones experimentales para el análisis de especies del género <i>Clinopodium spp</i>	246
9.2 Componentes volátiles hallados en <i>C. odorum</i> por análisis del aceite esencial y HS-SPME	247
9.3 Componentes volátiles hallados en <i>C. gilliesii</i> por análisis del aceite esencial y HS-SPME	253
9.4 Compuestos orgánicos volátiles encontrados por HS-SPME en <i>C. odorum</i> silvestre e in vitro micro propagadas en diferentes medios	260
Capítulo 10	
10.1 Optimización de las condiciones experimentales para el análisis de orégano	273
10.2 Componentes volátiles hallados en muestras de orégano cultivado en Córdoba, Argentina, por análisis del aceite esencial y por HS-SPME	275
10.3 Componentes volátiles hallados en muestras comerciales de orégano por HS-SPME	286
10.4 Autovalores de la matriz de correlación del Análisis de Componentes Principales	289
10.5 Resultados de la prueba de aceptabilidad de orégano en cuanto al atributo <i>sabor</i> .	291
10.6 Resultados de la prueba de aceptabilidad de orégano en cuanto al atributo <i>olor</i> ...	292
10.7 Resultados de la prueba de aceptabilidad de orégano en cuanto los atributos <i>olor</i> y <i>sabor</i>	293

	Pág.
10.8 Correlación de Spearman ($\alpha = 0,05$) entre las medias de los atributos sensoriales (olor y sabor) y las cantidades de componentes volátiles presentes en muestras de orégano comercial	297
10.9 Estimadores de RLM para los atributos <i>olor</i> y <i>sabor</i>	300

o

Índice de Figuras

	Pág.
Capítulo 1	
1.1 Interacciones de las plantas con el medio ambiente circundante mediadas por componentes volátiles	14
1.2 Elementos básicos del metabolismo primario y su relación con el metabolismo secundario de plantas	16
1.3 Vista general de las vías biosintéticas que conducen a la emisión de compuestos orgánicos volátiles	17
1.4 Unidad de isopreno	18
1.5 Acoplamiento cabeza-cola de dos unidades isoprenicas	20
1.6 Síntesis de compuestos orgánicos volátiles terpenoides	21
1.7 Síntesis de compuestos orgánicos volátiles benzenoides y fenilpropanoides	24
1.8 Síntesis de compuestos orgánicos volátiles derivados de ácidos grasos y volátiles de hojas verdes (GLVs)	25
1.9 Estructura química de indol	26
1.10 Síntesis de compuestos orgánicos volátiles derivados de aminoácidos de cadena ramificada	27
1.11 Modelo de emisión por difusión. J_{sin} y J_{emi} son los flujos de síntesis y emisión respectivamente	30
1.12 Modelos propuestos por Widhalm <i>et al</i> (2015) para el tráfico y emisión de compuestos orgánicos volátiles en células vegetales	32
1.13 Factores que afectan la emisión de volátiles de las plantas	34
Capítulo 2	
2.1 Representación esquemática de un equipo para hidrodestilación	39
2.2 Representación esquemática de equipo para destilación por arrastre con vapor de agua	40
2.3 Sistema de extracción combinada con destilación	42
2.4 Mecanismo de calentamiento de agua en un campo de microondas	43
2.5 Esquema de un equipo de hidrodestilación asistida por microondas	44
2.6 Diagrama de fases de una sustancia pura en sistema cerrado	46
2.7 Esquema de un proceso de extracción con CO ₂ supercrítico	46
2.8 Diagrama de fases del agua	47
2.9 Fenómeno de cavitación durante el ultrasonido de alta intensidad	50
2.10 Modos de extracción con barras de agitación recubiertas con PDMS	52
2.11 Análisis del espacio de cabeza dinámico	55
2.12 Esquema de un sistema de purga y trampa	56

	Pág.
2.13 Arrastre y recolección de compuestos volátiles en un sistema de arrastre en circuito cerrado	57
2.14 Ejemplos de sistemas de extracción y de extracción y empuje	59
2.15 Etapas en el análisis del espacio de cabeza estático manual	60
2.16 Microextracción en una gota única del espacio de cabeza	62
2.17 Microextracción en fase sólida del espacio de cabeza	64
2.18 Microextracción en fase sólida del espacio de cabeza dinámico	65
2.19 Análisis de componentes principales de los aceites esenciales de hierbabuena de Italia y de Estados Unidos	68
Capítulo 3	
3.1 Vial de espacio de cabeza que contiene una muestra líquida	74
3.2 Dependencia entre la temperatura y la presión de vapor de saturación del agua ...	80
3.3 Variación del área de picos cromatográficos en función del tiempo a temperatura constante en una optimización de equilibrado del espacio de cabeza	86
3.4 Diseño de la primera fibra comercial de microextracción en fase sólida por Supelco	88
3.5 Tipos de muestreo mediante microextracción en fase sólida: por inmersión directa en la muestra líquida o en el espacio de cabeza	88
3.6 Proceso de extracción de analitos sobre el recubrimiento de una fibra de microextracción en fase sólida del espacio de cabeza	89
3.7 Preparación de muestra con SPME	90
3.8 Equilibrio de distribución del analito en un sistema trifásico	91
3.9 Efecto del espesor del revestimiento de la fibra en función del tiempo para la extracción de 0,1 ppm de benceno desde una solución acuosa agitada de 2,500 rpm	92
3.10 Efecto de la afinidad de la fase extractante sobre la extracción de muestras de 0,1 ppm de tres analitos diferentes	93
3.11 Efecto de la temperatura sobre el coeficiente de partición del analito entre la fase extractante de la fibra y la muestra	94
3.12 El espacio de cabeza como barrera que impide el paso de interferencias desde la matriz de la muestra hacia la fase extractante de la fibra	97
3.13 Perfil típico del tiempo de extracción por microextracción en fase sólida	98
3.14 Distribución del analito en la microextracción en fase sólida del espacio de cabeza como función de las tasas de transferencia de materia	99
3.15 Efecto de la temperatura sobre la velocidad de microextracción de metanfetamina	99
3.16 Tiempos de extracción de diferentes analitos volátiles	100

	Pág.
3.17 Mecanismos de sorción en fibras con recubrimiento líquido y sólido	103
3.18 Viales para microextracción en fase sólida del espacio de cabeza y accesorios relacionados	105
3.19 Clasificación de las fibras comerciales según el mecanismo de extracción involucrado	106
3.20 Estructuras químicas de los polímeros más comúnmente utilizados como recubrimiento de las fibras para SPME	106
3.21 Estructura de polidimetilsiloxano	107
3.22 Fibra recubierta por CAR-PDMS	110
3.23 Fibra de divinilbenceno-carboxeno-polidimetilsiloxano (DVB-CAR-PDMS)	112
3.24 Propiedades de las fibras de SPME comercialmente disponibles en cuanto a polaridad y capacidad de retención	112
3.25 Procedimiento general de análisis de compuestos volátiles por microextracción en fase sólida del espacio de cabeza	113
3.26 Rango de pesos moleculares extraídos con cada tipo de fibra de microextracción en fase sólida	114
3.27 Ejemplos de optimización para la selección del tipo de fibra para HS-SPME	116
3.28 Ejemplo de optimización para la selección de la temperatura de extracción de volátiles de <i>Capsicum annum</i> fresco por HS-SPME	117
3.29 Ejemplo de optimización para la selección del tiempo de extracción para de extracción de los componentes del aroma de carne cocida por HS-SPME	117
3.30 Número de publicaciones científicas relacionadas con microextracción en fase sólida desde 1990 hasta 2015	118
Capítulo 4	
4.1 Concepto de calidad sensorial como interacción entre las características intrínsecas del alimento y el consumidor	122
4.2 Concepto de percepción sensorial como mecanismo de respuesta cerebral al estímulo provocado por las características organolépticas de los alimentos, las que se interpretan e integran con otras sensaciones y con la experiencia anterior conformando la percepción	123
4.3 Sensograma que destaca las principales impresiones que tiene el consumidor o el evaluador al momento de realizar un análisis sensorial a un alimento	124
4.4 Fisiología del gusto y las cinco sensaciones sápidas primarias: dulce, salado, ácido o agrio, amargo y umami	125

	Pág.
4.5 Fisiología del olfato. Las moléculas volátiles entran por la nariz y son reconocidas por los sensores olfativos del epitelio olfativo. Éstos envían señales al bulbo olfativo y la señal se transmite al lóbulo frontal del cerebro que es la zona sensorial del olor	126
4.6 Diferencia entre olor y aroma. En el olor los compuestos volátiles ingresan a los sensores olfativos por la vía nasal, mientras que en el aroma, lo hacen luego de que el alimento está en la boca por la vía retronasal	126
4.7 Morfología del ojo humano	127
4.8 Estructura del oído	128
4.9 Concepto de flavor como conjunto complejo de las propiedades olfativas y gustativas que se perciben durante la degustación, influido por las propiedades táctiles y efectos cenestésicos, esto es, los sonidos relacionados con el alimento (masticación, burbujas, entre otros)	129
4.10 Ejemplos de escalas hedónicas	132
Capítulo 5	
5.1 Esquema de un programa de micropropagación	145
5.2 Ubicación de la zona geográfica del campo de cultivo de coriandro, en el Departamento Totoral de la Provincia de Córdoba, Argentina	148
5.3 Modelo de encuesta utilizado para la prueba de aceptabilidad sensorial de orégano	152
5.4 Material entregado a cada juez para la prueba de aceptabilidad de orégano	153
Capítulo 6	
6.1 <i>Tagetes minuta</i> L.	157
6.2 <i>Tagetes filifolia</i> Lag.	158
6.3 <i>Tagetes argentina</i> Cabrera	159
6.4 Efecto del tipo de fibra sobre el proceso de microextracción de componentes volátiles de <i>T. minuta</i>	160
6.5 Efecto de la temperatura sobre el proceso de microextracción de componentes volátiles de <i>T. minuta</i>	161
6.6 Efecto del tiempo de equilibrado del HS sobre el proceso de microextracción de componentes volátiles de <i>T. minuta</i>	162
6.7 Efecto del tiempo de exposición de la fibra en el HS sobre el proceso de microextracción de componentes volátiles de <i>T. minuta</i>	163
6.8 Algunos componentes volátiles hallados en <i>T. minuta</i> por análisis del aceite esencial y por muestreo mediante HS-SPME	166
6.9 Componentes volátiles mayoritarios de <i>T. filifolia</i> Lag.	169
6.10 Componentes volátiles mayoritarios de <i>T. argentina</i> Cabrera	172

	Pág.
Capítulo 7	
7.1 <i>Lantana camara</i> L.	177
7.2 <i>Lantana balansae</i> Briq.	180
7.3 <i>Lantana grisebachii</i> Seckt.	180
7.4 Efecto del tipo de fibra sobre el proceso de microextracción de componentes volátiles de <i>L. camara</i>	182
7.5 Efecto de la temperatura sobre el proceso de microextracción de componentes volátiles de <i>L. camara</i>	183
7.6 Efecto del tiempo de equilibrado del HS sobre el proceso de microextracción de componentes volátiles de <i>L. camara</i>	184
7.7 Efecto del tiempo de exposición de la fibra en el HS sobre el proceso de microextracción de componentes volátiles de <i>L. camara</i>	185
7.8 Componentes volátiles mayoritarios hallados en <i>L. balansae</i> por análisis del aceite esencial y por muestreo mediante HS-SPME	187
7.9 Componentes volátiles mayoritarios de <i>L. grisebachii</i>	191
7.10 Componentes volátiles encontrados en las distintas variedades de <i>L. camara</i> estudiadas	200
7.11 Gráfico de las componentes principales 1 y 2 rotados, resultantes del PCA sobre la matriz de correlación de los compuestos volátiles presentes en las especies de <i>Lantana</i> estudiadas por HS-SPME	213
7.12 Dendograma obtenido al realizar un Análisis por Conglomerados jerárquicos con el método de encadenamiento promedio y distancia Jaccard sobre la base de la variedad de compuestos volátiles de las especies de <i>Lantana</i> estudiadas	213
Capítulo 8	
8.1 <i>Coriandrum sativum</i> L.	215
8.2 Fruto de <i>Coriandrum sativum</i> L.	215
8.3 Semillas de <i>Coriandrum sativum</i> L.	217
8.4 Efecto del tipo de fibra sobre el proceso de microextracción de componentes volátiles de <i>C. sativum</i>	220
8.5 Efecto de la temperatura sobre el proceso de microextracción de componentes volátiles de <i>C. sativum</i>	221
8.6 Efecto del tiempo de equilibrado del HS sobre el proceso de microextracción de componentes volátiles de <i>C. sativum</i>	222
8.7 Efecto del tiempo de exposición de la fibra en el HS sobre el proceso de microextracción de componentes volátiles de <i>C. sativum</i>	222
8.8 Componentes volátiles hallados en las semillas de <i>C. sativum</i> por análisis del aceite esencial y por muestreo mediante HS-SPME	224

	Pág.
8.9 Áreas totales de los cromatogramas de semillas en polvo de <i>C. sativum</i> medidas por HS-SPME durante el almacenamiento	228
8.10 Áreas totales de los cromatogramas de semillas enteras de <i>C. sativum</i> medidas por HS-SPME durante el almacenamiento en silobolsa	230
8.11 Datos de precipitaciones y grados de crecimiento diario acumulado mensual de los años de producción de coriandro 2010, 2011 y 2012 en Cañada de Luque, Córdoba, Argentina	234
8.12 Áreas totales de los cromatogramas de semillas de <i>C. sativum</i> medidas por HS-SPME según año de producción	235
Capítulo 9	
9.1 <i>Clinopodium odorum</i>	240
9.2 <i>Clinopodium gilliesii</i>	241
9.3 Efecto del tipo de fibra sobre el proceso de microextracción de componentes volátiles de <i>C. odorum</i>	243
9.4 Efecto de la temperatura sobre el proceso de microextracción de componentes volátiles de <i>C. odorum</i>	244
9.5 Efecto del tiempo de equilibrado del HS sobre el proceso de microextracción de componentes volátiles de <i>C. odorum</i>	245
9.6 Efecto del tiempo de exposición de la fibra en el HS sobre el proceso de microextracción de componentes volátiles de <i>C. odorum</i>	246
9.7 Algunos componentes volátiles hallados en <i>C. odorum</i> por análisis del aceite esencial y por muestreo mediante HS-SPME	249
9.8 Distribución de terpenos oxigenados en <i>C. odorum</i> obtenidos por HS-SPME y en el aceite esencial	251
9.9 Posibles transformaciones de los principales compuestos orgánicos volátiles de <i>C. odorum</i> durante el proceso de secado e hidrodestilación	251
9.10 Algunos componentes volátiles hallados en <i>C. gilliesii</i> por análisis del aceite esencial y por muestreo mediante HS-SPME	255
9.11 Gráfico de los componentes principales 1 y 2 rotados, resultantes del PCA sobre la matriz de correlación de los compuestos volátiles presentes en <i>C. odorum</i> silvestre y micropropagadas in vitro	264
9.12 Dendograma obtenido al realizar un Análisis por Conglomerados jerárquicos con el método de encadenamiento promedio y distancia Euclídea sobre la base de la variedad de compuestos volátiles presentes en <i>C. odorum</i> silvestre y cultivadas in vitro	264
Capítulo 10	
10.1 Tipos de orégano producidos en Córdoba, Argentina	268

	Pág.
10.2 Efecto del tipo de fibra sobre el proceso de microextracción de componentes volátiles totales de orégano comercial	270
10.3 Efecto del tipo de fibra sobre el área de los picos mayoritarios de orégano	270
10.4 Efecto de la temperatura sobre la microextracción sobre el área total de picos del cromatograma de orégano comercial	270
10.5 Efecto de la temperatura de extracción sobre las áreas de los componentes mayoritarios del orégano comercial	272
10.6 Efecto de la temperatura de extracción sobre las áreas de los componentes minoritarios del orégano comercial	272
10.7 Efecto del tiempo de equilibrado del HS y de exposición de la fibra sobre la microextracción de componentes volátiles de orégano comercial	273
10.8 Algunos componentes volátiles hallados en las muestras de los tipos de orégano producido en Córdoba, Argentina	274
10.9 Distribución de terpenos oxigenados en <i>Origanum x majoricum</i> obtenidos por HS-SPME y en el aceite esencial	279
10.10 Esquema propuesto por Fisher <i>et al.</i> (1987, 1988) para las secuencias de reacciones que conducen al reordenamiento de <i>trans</i> y <i>cis</i> -sabineno hidrato para formar 4-terpineol, α -terpineno y <i>p</i> -cimeno durante la hidrodestilación de <i>O. majorana</i>	279
10.11 Distribución de terpenos oxigenados en orégano compacto obtenidos por HS-SPME y en el aceite esencial	282
10.12 Algunos componentes volátiles hallados en las muestras de orégano comercial por muestreo mediante HS-SPME	288
10.13 Gráfico de los componentes principales 1 y 2 rotados, resultantes del PCA sobre la matriz de correlación de los CVV presentes en las nueve muestras comerciales de orégano	289
10.14 Gráfico de los componentes principales 1 y 3 rotados, resultantes del PCA sobre la matriz de correlación de los CVV presentes en las nueve muestras comerciales de orégano	289
10.15 Gráfico de los componentes principales 2 y 3 rotados, resultantes del PCA sobre la matriz de correlación de los CVV presentes en las nueve muestras comerciales de orégano	290
10.16 Dendograma obtenido al realizar un Análisis por Conglomerados jerárquicos con el método de encadenamiento promedio y distancia Euclídea sobre la base de la variedad de CVV de las muestras comerciales de orégano y las cuatro primeras componentes principales	290

	Pág.
10.17 Promedios de aceptabilidad de orégano obtenidos para el atributo <i>sabor</i>	292
10.18 Promedios de aceptabilidad de orégano obtenidos para el atributo <i>olor</i>	293
10.19 Medias de aceptabilidad en cuanto a <i>olor</i> y a <i>sabor</i> de muestras de orégano	294
10.20 Dendograma obtenido al realizar un Análisis por Conglomerados jerárquicos con el método de encadenamiento promedio y distancia Euclídea sobre la base de la variedad de aceptabilidad de las muestras comerciales de orégano	295
10.21 Biplot de las componentes principales 1 y 2 rotados, resultantes del PCA sobre la matriz de correlación de los atributos sabor y olor para las muestras de orégano	296
10.22 Gráficos de correlación lineal significativos entre las medias de aceptabilidad obtenidas para el atributo <i>olor</i>	299
10.23 Gráficos de correlación lineal significativos entre las medias de aceptabilidad obtenidas para el atributo <i>sabor</i>	299

Abreviaturas y símbolos

γ : coeficiente de actividad.

δ : densidad.

β : relación de volúmenes de las dos fases involucradas en el equilibrio muestra-espacio de cabeza .

AACT: enzima acetoacetyl-CoA tiolasa.

AE: aceite esencial.

AE: aceite esencial.

ANOVA: análisis de la varianza.

B5: medio Gamborg para micropropagación *in vitro* de plantas.

BAP: 6-Benzilaminopurina.

CA: ácido *trans*-cinámico.

CAR: carboxeno.

CLS: arrastre en circuito cerrado (en inglés: *closed-loop stripping*).

CV: coeficiente de variación: cociente entre la desviación estándar y la media multiplicado por 100.

CVV: compuestos volátiles vegetales.

DAHPP: 3-desoxi-D-arabinoheptulosonato-7-fosfato.

DMAPP: dimetilalilpirofosfato.

DMNT: 4,8-dimetilnona-1,3,7-trieno.

DVB: divinilbenceno.

DXP: 1-desoxi-D-xilulosa-5-fosfato.

E4P: D-eritrosa-4-fosfato.

E4P: ritrosa-4-fosfato.

EI: impacto de electrones (en inglés: *electron impact*).

FA: fenilalanina.

FID: detector de ionización de llama (en inglés: *flame ionization detector*).

FPP: farnesilpirofosfato.

GAP: D-gliceraldehído-3-fosfato.

GC: cromatografía de gases (en inglés: *gas chromatography*).

GDD: suma térmica o grados de crecimiento diario (en inglés: *growing degree days*).

GGPP: geranilgeranilpirofosfato.

GLVs: compuestos volátiles de hojas verdes (en inglés: *green leaf volatiles*).

GPP: geranilpirofosfato.

HD: hidrodestilación.

HIPVs: volátiles vegetales inducidos por herbívoros (en inglés: *herbivore-induced plant volatiles*).

HS: espacio de cabeza (en inglés: *headspace*).

IDI: enzima isopentenil difosfato isomerasa.

IPP: isopentenilpirofosfato.

JA: ácido jasmónico.

K_D: coeficiente de distribución, partición o reparto

KI: índices de retención Kovat's contra estándar de alcanos normales.

LOX: enzima lipoxigenasa.

LPME: microextracción en fase líquida (en inglés: *liquid phase microextraction*).

MAHD: hidrodestilación asistida por microondas (en inglés: *microwave-assisted hydrodistillation*).

MASE: extracción con solvente asistida por microondas (en inglés: *microwave-assisted solvent extraction*).

MEP: fosfato de metileritritol.

MS: espectrometría de masas (en inglés: *mass spectrometry*).

MS: medio Murashige and Skoog para micropropagación *in vitro* de plantas.

MVA: ácido mevalónico.

NAA: 2-Naftaleno en ácido acético.

NPP: nerilpirofosfato.

PA: poliacrilato.

PAL: enzima L-fenilalanina amonio liasa.

PCA: análisis de componentes principales (en inglés: *principal component analysis*).

PDMS: Polidimetilsiloxano.

PDMS: polidimetilsiloxano.

PEG: polietilenglicol.

PEP: fosfoenolpiruvato.

PEP: Fosfoenolpiruvato.

PGRs: reguladores de crecimiento para medios de cultivo de plantas.

ppb: partes por billón

PPP: pentosa fosfato.

PSE: extracción con solvente a alta presión (en inglés: *pressurized solvent extraction*).

RE: retículo endoplásmico.

RLM: Regresión Lineal Múltiple.

SBSE: Extracción por sorción en barra de agitación extractiva (en inglés: *stir bar sorptive extraction*).

SDE: extracción con solvente combinada de manera simultánea con la destilación (en inglés: *simultaneous distillation extraction*)

SDME: microextracción en una gota única del espacio de cabeza (en inglés: *single drop microextraction*).

SFE: extracción con fluido supercrítico (en inglés: *supercritical fluid extraction*).

SFME: extracción con microondas libre de solventes (en inglés: *solvent-free microwave extraction*).

SH: medio Schenk and Hildebrandt para micropropagación *in vitro* de plantas.

SPME: microextracción en fase sólida (en inglés: *solid phase microextraction*).

SWE: extracción continua con agua subcrítica (en inglés: *subcritical water extraction*).

TMTT: 4,8,12-trimetiltrideca-1,3,7,11-tetraeno.

TPSs: conjunto de enzimas terpenos sintetetasas/ciclasas.

UAE: extracción asistida por ultrasonidos (en inglés: *ultrasound-assisted extraction*).

WP: medio Lloyd and McCown para micropropagación *in vitro* de plantas.

ΔH : cambio de entalpia.

$\mu g/h$: microgramos/hora.

INTRODUCCIÓN

El concepto de calidad ha evolucionado en los últimos años adquiriendo, tanto en los países desarrollados como en aquellos en vías de desarrollo, un extraordinario protagonismo. En un contexto económico caracterizado por la saturación de los mercados de países desarrollados, la calidad es un elemento básico en la estrategia de los sectores productivos y un elemento determinante de la elección de los consumidores. Según la Organización Internacional de Normalización (IRAM-ISO, 2008), la calidad es la capacidad de un producto o servicio de satisfacer las necesidades declaradas o implícitas del consumidor a través de sus propiedades o características. De esta manera, la adecuación es definida por el usuario o consumidor.

Una especie aromática puede ser descripta mediante una serie de parámetros o variables (físicas, químicas, microbiológicas) que se transforman en atributos de calidad por la percepción y preferencias de un usuario (productor, industrial, inspector, consumidor). Los valores que deben alcanzar los atributos para que la adecuación sea positiva, son las especificaciones de calidad. Para el caso de la industria alimentaria, es de gran importancia entender la relación existente entre las propiedades y los atributos de calidad percibidos, ya que un conocimiento adecuado de dichas propiedades, permitirá incorporar al producto final los atributos de calidad deseados mediante la gestión de los procesos a lo largo de la cadena alimentaria (Prieto *et al.*, 2008; Hu *et al.*, 2012; Lee & Yun, 2015).

Entre los atributos de calidad de una especie aromática se encuentra la composición química de su fracción volátil. Los componentes químicos volátiles, estimulan las terminales sensitivas de boca y nariz, afectando a las variables olor, aroma, gusto y flavor (Meilgaard *et al.*, 2007). Por lo tanto, identificar dichos componentes y determinar su proporción en el producto es de vital importancia para establecer correlaciones con las respuestas sensoriales (Flores *et al.*, 1997; Wittig de Penna, 2005; Quíllez *et al.*, 2006; Kalua *et al.*, 2007; Altisent *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2008; García-González *et al.*, 2008; Grigorakis *et al.*, 2009; Heenan *et al.*, 2009; González Álvarez *et al.*, 2011; Jumtee *et al.*, 2011; Lin *et al.*, 2012; Lv *et al.*, 2012; Lv *et al.*, 2015).

Los atributos de calidad organoléptica o sensorial, que puede ser definida, medida y ponderada, establece niveles de confianza para el cumplimiento de las especificaciones de calidad acordadas. Por este motivo, la apreciación sensorial tiene gran importancia en la evaluación de la calidad por parte del consumidor y, si no alcanza un nivel suficiente, se produce un rechazo que las otras características de calidad no pueden compensar (Costa *et al.*,

2003; Garber *et al.*, 2003; Prieto *et al.*, 2008; Grunert *et al.*, 2010; Dickson-Spillmann *et al.*, 2011; Ouyang *et al.*, 2014; Sliwinska *et al.*, 2014).

La importancia de los distintos atributos variará dependiendo de quién juzgue la calidad (productor, fabricante, distribuidor, consumidor o regulador), ya que cada uno presta más atención a determinados atributos de calidad. La etapa de la cadena agroalimentaria en la que se evalúa o gestiona la calidad tiene, por lo tanto, importancia crucial, ya sea en el punto de obtención o cosecha, de industrialización, distribución, venta o consumo (Costa *et al.*, 2004; Delwiche, 2007; Pietro *et al.*, 2008).

La producción de especias y hierbas aromáticas en volumen y superficie cubierta en Argentina no es muy extensa, ya que se trata de cultivos no tradicionales. Los cultivos se encuentran diseminados por toda la geografía de nuestro país, con especies características de cada zona, de acuerdo a las condiciones climáticas y culturales de cada región.

Actualmente uno de los desafíos del sector es poder contar con herramientas que permitan determinar la calidad del producto final y, de esta manera, alcanzar estándares establecidos para lograr certificaciones de calidad y poder competir en los mercados extranjeros. Además, es importante generar factores de diferenciación de las especies cultivadas que posibiliten el desarrollo de una marca regional o denominación de origen controlada (COFECYT, 2013; Parra & Cameroni, 2009).

Las herramientas de control de calidad de plantas aromáticas, deberían incluir no solo análisis químicos (especialmente la determinación de componentes volátiles) sino también análisis sensoriales, además de la utilización de metodologías estadísticas que ayuden a la correcta interpretación de los resultados. El establecimiento de relaciones químico-sensoriales a partir de estudios de correlación estadística entre los datos de composición y aceptación sensorial, podría permitir identificar los componentes volátiles responsables de la aceptación o rechazo de un producto, así como también seleccionar aquellas variedades, de una misma especie, que presenten una mayor cantidad del o los compuestos que mejoren su aceptación y una menor cantidad del o los compuestos que disminuyan su rechazo.

Hipótesis de Trabajo:

La Micro Extracción en Fase Sólida del Espacio de Cabeza combinada a la Cromatografía de Gases resulta una herramienta eficaz, sencilla y útil para determinar perfiles quimiométricos en especies vegetales, que, combinados con análisis sensoriales y herramientas estadísticas, permiten establecer parámetros de calidad.

Objetivo General:

Utilizar la Micro-Extracción en Fase Solida como metodología analítica de muestreo de compuestos orgánicos volátiles tendiente a caracterizar especies vegetales de las familias Apiaceae, Asteraceae, Lamiaceae y Verbenaceae y correlacionar, en los casos de aquellas de uso alimenticio, estos resultados con los datos aportados por el análisis sensorial mediante la utilización de metodologías estadísticas.

Objetivos Particulares:

- a) Estudiar el proceso de optimización de la metodología analítica basada en la HS-SPME; determinar los parámetros característicos tales como tipo de fibra empleada, tiempo de equilibrio, temperatura de extracción y tiempo de exposición de la fibra al espacio de cabeza.
- b) Aplicar la metodología de HS-SPME a la caracterización de compuestos volátiles presentes en especies representativas de las familias Apiaceae, Asteraceae, Lamiaceae y Verbenaceae.
- c) Establecer similitudes y diferencias de la caracterización de volátiles por HS-SPME y por la técnica clásica de análisis del aceite esencial obtenido por hidrodestilación.
- d) Establecer similitudes y diferencias entre distintas especies del mismo género por HS-SPME.
- e) Estudiar el efecto del tiempo y las condiciones de almacenamiento sobre la composición de los compuestos volátiles presentes en las muestras.
- f) Realizar análisis de aceptabilidad sensorial con aquellas especies de uso alimenticio para establecer cuáles son las muestras que presentan mejor aceptación por parte de los consumidores.
- g) Establecer relaciones químico-sensoriales entre los datos de los perfiles químicos aportados por los análisis de los volátiles mediante la técnica de HS-SPME y los resultados de los análisis sensoriales, mediante el empleo de metodologías de análisis estadístico de correlación con la finalidad de determinar los componentes volátiles responsables de la aceptación o rechazo de la muestras.

1º PARTE:

MARCO TEÓRICO

Capítulo 1

Los componentes volátiles responsables del aroma de las plantas

-
- 1.1- Funciones de los compuestos volátiles vegetales.
 - 1.1.1- Rol de los componentes volátiles en los procesos de reproducción vegetal.
 - 1.1.2- Rol de los componentes volátiles en mecanismos de defensa vegetal.
 - 1.1.3- Rol de los componentes volátiles en las interacciones tritróficas.
 - 1.1.4- Rol de los componentes volátiles en las interacciones con otras plantas.
 - 1.1.5- Rol de los compuestos volátiles en procesos de estrés abiótico.
 - 1.2- Biosíntesis de los compuestos volátiles vegetales.
 - 1.2.1- Biosíntesis de terpenoides.
 - 1.2.2- Biosíntesis de compuestos bencenoides y fenilpropanoides.
 - 1.2.3- Biosíntesis de compuestos volátiles derivados de ácidos grasos.
 - 1.2.4- Biosíntesis de compuestos volátiles derivados de aminoácidos de cadena ramificada.
 - 1.3- Emisión de volátiles desde los vegetales a la atmósfera.
 - 1.3.1- Modelos de emisión basados en la difusión.
 - 1.3.2- Modelos de emisión que involucran mecanismos biológicos.
 - 1.4- Regulación de la emisión de compuestos volátiles vegetales.
-

Desde la antigüedad se sabe que tanto las partes florales como vegetativas de muchas especies vegetales emiten sustancias con olores característicos capaces de perfumar el ambiente a su alrededor. Los componentes volátiles responsables del aroma de las plantas, son producidos y emitidos a la atmósfera desde las hojas, flores y frutos, y al suelo desde las raíces (Steegs *et al.*, 2004; Huang *et al.*, 2012; Fineschi *et al.*, 2013), como resultado de un proceso evolutivo de adaptación para compensar su inmovilidad (Dudareva *et al.*, 2006; Niinemets *et al.*, 2013). En este sentido, siendo organismos sésiles, las plantas no tienen la capacidad de moverse para escapar de otros organismos perjudiciales y las condiciones a las que están expuestos. Por lo tanto, han desarrollado una gran diversidad de productos químicos para hacer frente a esos factores adversos. Los compuestos volátiles vegetales (CVV) están entre los compuestos más relevantes usados por los diferentes tejidos de las plantas para interactuar con sus ambientes bióticos y abióticos (Farré-Armengol *et al.*, 2013; Muhlemann *et al.*, 2014).

Los CVV incluyen principalmente isoprenoides volátiles, fenilpropanoides, benzoides, carbohidratos y productos derivados de ácidos grasos y de aminoácidos de cadena ramificada (Dudareva *et al.*, 2004; Dicke & Baldwin, 2010; Niinemets *et al.*, 2013). En algunos casos, se producen CVV especializados como los productos de escisión de glucosinolatos que contienen azufre (Berenbaum & Zangerl, 2008; Agrawal, 2011). Debido a las diferencias

significativas en las características físico-químicas de los CVV dentro y entre las diferentes clases de compuestos, la cinética de liberación, el tiempo de vida del compuesto en la atmósfera circundante y la absorción por la vegetación vecina, varían fuertemente (Niinemets *et al.*, 2013).

Los CVV son sustancias lipofílicas (o hidrofóbicas), con elevadas presiones de vapor a temperatura ambiente. Estas propiedades les permiten atravesar libremente las membranas y ser liberadas al medioambiente circundante cuando no hay barreras para la difusión (Pichersky *et al.*, 2006; Muhlemann *et al.*, 2014; Widham *et al.*, 2015). La mayoría de estas sustancias químicas están restringidas a linajes vegetales específicos, e involucradas en interacciones ecológicas propias de cada especie, por lo que se consideran *metabolitos secundarios*, o también denominados *metabolitos especializados* (Pichersky & Gang, 2000). Se han descrito más de 1700 metabolitos especializados, de los cuales aproximadamente el 1 % corresponde a CVV identificados en las flores de aproximadamente 90 familias diferentes de angio y gimnospermas (Dudareva *et al.*, 2013; Muhlemann *et al.*, 2014).

Es de destacar que recientemente, el desarrollo de técnicas de biología molecular, ha permitido dilucidar gran parte los caminos de biosíntesis de los CVV, sus mecanismos de regulación y la función que cumplen en la vida de las especies vegetales (Dudareva *et al.*, 2004; Muhlemann *et al.*, 2014) y en los procesos ecológicos (Raguso, 2008). El estudio de la composición química de las mezclas volátiles emitidas por las plantas y su intensidad, han permitido obtener información sobre su estado fisiológico y el estrés al que han sido sometidas (Dudareva *et al.*, 2006; Niinemets *et al.*, 2013).

1.1- Funciones de los compuestos volátiles vegetales

Los CVV cumplen diversas funciones en la vida de las plantas. Esta capacidad de interactuar químicamente con su entorno surgió tempranamente en la evolución del reino vegetal y se diversificó ampliamente (Chen *et al.*, 2011; Paul & Pohnert, 2011). Las emisiones volátiles de las plantas pueden ser *constitutivas* o pueden ser *inducidas* en respuesta a una variedad de situaciones de estrés (Niinemets *et al.*, 2013). Entre las *constitutivas* se encuentran las relacionadas con los mecanismos de reproducción, mientras que las *inducidas* incluyen, por ejemplo, las reacciones de defensa contra herbívoros y microorganismos patógenos (intra e inter plantas).

Se ha estudiado ampliamente el rol de los CVV como mediadores en distintos tipos de interacciones con otros organismos vivos o *interacciones bióticas*, y con diversos factores físicos y químicos ambientales o *interacciones abióticas* (Niinemets *et al.*, 2013).

1.1.1- *Rol de los componentes volátiles en los procesos de reproducción vegetal*

Una de las funciones más importantes de los CVV está relacionada con la reproducción vegetal. Más del 85% de las especies de plantas con flores dependen de los insectos para su polinización (Ollerton, 2011). Para atraer polinizadores y difusores de semillas y asegurar así el éxito reproductivo y evolutivo de numerosas especies de plantas, liberan diversas mezclas de compuestos volátiles desde sus flores y frutos, además de señales visuales y táctiles (Reinhard *et al.*, 2004; Dudareva *et al.*, 2006; Farré-Armengol *et al.*, 2013). En este sentido, si bien las flores pueden ser idénticas en su color o forma, no hay dos aromas florales que sean exactamente iguales debido a la gran diversidad de CVV y sus abundancias relativas. Por lo tanto, el olor floral en combinación con el color, son señales que los polinizadores pueden utilizar para discriminar una flor particular entre distintas especies de plantas e incluso entre las flores individuales de una misma especie (Chittka & Raine, 2006). Por este motivo, los componentes de los aromas florales aumentan la discriminación de los colores por parte de los agentes polinizadores, por lo que la combinación de señales cromáticas y aromáticas, mejora la formación y recuperación de recuerdos en los polinizadores (Kunze & Gumbert, 2001; Raguso, 2004; Wright *et al.*, 2009). Por ejemplo, en las plantas que florecen de noche, las señales olfativas son más confiables para los polinizadores que los rasgos visuales (Jürgens *et al.*, 2002; Carvalho, 2012).

Las flores pueden sintetizar y emitir de 1 a 100 compuestos volátiles diferentes, pero la mayoría de las especies emiten entre 20 y 60 (Knudsen & Gershenzon, 2006). La cantidad total de volátiles florales emitidos varía en un rango que va desde unos pocos picogramos/hora hasta más de 30 µg/h, siendo mayores las cantidades producidas por flores de diversas especies polinizadas por escarabajos y polillas (Knudsen & Gershenzon, 2006). Incluso especies de plantas estrechamente relacionadas que dependen de diferentes tipos de insectos para la polinización, producen distintos olores que reflejan las sensibilidades olfativas o preferencias de sus polinizadores (Raguso & Pichersky, 1995; Hoballah *et al.*, 2005; Wright *et al.*, 2005; Dudareva *et al.*, 2006). Además, dentro de una especie, el nivel de emisión de olor cambia en respuesta a ritmos diurnos endógenos, edad de la flor, estado de

polinización y condiciones ambientales tales como luz, temperatura y humedad (Dudareva *et al.*, 2004).

Por otra parte, los compuestos volátiles emitidos por los frutos determinan las propiedades de sabor y aroma en general y, por lo tanto, pueden desempeñar un papel importante en la atracción de los animales dispersores de semillas (Bolen & Green, 1997; Luft *et al.*, 2003; Goff & Klee, 2006).

1.1.2- *Rol de los componentes volátiles en mecanismos de defensa vegetal*

En las últimas décadas se han publicado numerosos artículos científicos demostrando que las plantas producen mezclas de compuestos volátiles en tejidos vegetativos como mecanismo de autoprotección contra el ataque de herbívoros (Dudareva *et al.*, 2006; Farré-Armengol *et al.*, 2013; Niinemets *et al.*, 2013) y de microorganismos (Pichersky *et al.*, 1994; Chen *et al.*, 2003; Tholl *et al.*, 2005; Dudareva *et al.*, 2006).

Las mezclas de olores emitidas por las plantas infectadas o atacadas por herbívoros son mezclas complejas, a menudo conformadas por más de 200 compuestos diferentes, muchos de los cuales se presentan como constituyentes menores (Dicke & van Loon, 2000). Es interesante destacar que los CVV emitidos pueden inducir mecanismos de defensa *directos* o *indirectos*. Los mecanismos de defensa *directos* afectan directamente la fisiología y comportamiento de los agentes atacantes herbívoros debido a sus propiedades tóxicas o repelentes (Bernasconi *et al.*, 1998; De Moraes *et al.*, 2001; Kessler & Baldwin, 2001; Vancanneyt *et al.*, 2001; Aharoni *et al.*, 2003; Lucas-Barbosa *et al.*, 2011; Farré-Armengol *et al.*, 2013; Niinemets *et al.*, 2013). Mientras que, por otro lado, los mecanismos de defensa *indirectos* funcionan atrayendo a insectos carnívoros que atacan, a su vez, a los insectos herbívoros (Drukker *et al.*, 2000; Kessler & Baldwin, 2001; Lucas-Barbosa *et al.*, 2011). Además, algunos CVV pueden mediar tanto repeliendo la oviposición, como atrayendo a los enemigos de insectos herbívoros (Kessler & Baldwin, 2001). La respuesta particular, ya sea para atraer un carnívoro o repeler un herbívoro, depende fuertemente del nivel de inducción de la planta (Horiuchi *et al.*, 2003; Heil, 2004; Gols *et al.*, 2003), así como de la capacidad de los carnívoros y los parasitoides para discriminar diferentes mezclas de olores (Dicke, 1999). Sin embargo, los volátiles inducidos por herbívoros no siempre son beneficiosos para las plantas dañadas, ya que en algunos casos, otros herbívoros inespecíficos pueden ser atraídos por estas señales volátiles, lo que resulta en un mayor ataque para la planta (Bolter *et al.*,

1997; Horiuchi *et al.*, 2003). Las señales volátiles más comunes involucradas en estas defensas incluyen los metabolitos de la ruta de la lipoxigenasa, de la vía del shikimato y de las vías terpenoides (vía del ácido mevalónico y del fosfato de metileritritol) (Pichersky & Gershenzon, 2002; Lucas-Barbosa *et al.*, 2011; Heil, 2014).

Los CVV emitidos por inducción de insectos herbívoros se produce generalmente por elicitores provenientes de la saliva de los herbívoros que pueden ser específicos tanto de plantas como de especies de herbívoros (De Moraes *et al.*, 1998; Dicke, 1999). La composición de diferentes mezclas de olores también depende en gran medida del tipo de daño, por ejemplo, si es causado por la alimentación de herbívoros o por ovoposición (Hilker & Meiners, 2002; Hilker *et al.*, 2002). Mientras que algunos CVV son emitidos por plantas sanas, la acción combinada de daño mecánico y elicitores de los herbívoros atacantes, induce la emisión volátil ya sea, a través de la liberación de compuestos almacenados, o de un aumento de la biosíntesis de CVV que la planta ya producía o de CVV nuevos (Pare & Tumlinson, 1997; Turlings *et al.*, 1998; McCall, 2006; Kessler & Halitschke, 2009). No obstante, existe un período de tiempo entre la inducción y la liberación volátil subsiguiente. Algunos volátiles, incluyendo terpenos, indol y salicilato de metilo, no suelen emitirse hasta varias horas después de ocurrido el daño. Sin embargo, casi inmediatamente después de la herida, las hojas verdes liberan volátiles de aldehídos de seis átomos de carbono, alcoholes y ésteres, los cuales se consideran señales típicas de las heridas en vegetales (Hatanaka, 1993).

La composición de CVV emitidos por inducción de herbívoros depende, además, de varios factores abióticos tales como la humedad del suelo y del aire, la temperatura, la intensidad de la luz y la tasa de fertilización (De Moraes *et al.*, 1998; Gouinguene & Turlings, 2002; Vuorinen *et al.*, 2004; Dudareva *et al.*, 2006).

Muchos CVV tienen propiedades antimicrobianas para proteger estructuras florales, frutos y hojas contra la colonización por parte de comunidades bacterianas (Tholl *et al.*, 2005; Balduin, 2010; Junker *et al.*, 2011). Se sabe que las 2- α -metilcetonas abundantes en el olor del polen en *R. rugosa*, 2-undecanona y 2-tridecanona (Dobson *et al.*, 1990), son repelentes e incluso tóxicas para varios insectos (Kennedy *et al.*, 1991; Maluf *et al.*, 1997), teniendo algunas de ellas, además, actividad antimicrobiana y antifúngica (Cole *et al.*, 1975; Zaika, 1988; Knobloch *et al.*, 1989; Jayanth *et al.*, 1993; Kubo *et al.*, 1995). Estas plantas no sufren desventajas al presentar compuestos repelentes en sus flores porque no necesitan atraer polinizadores (Dobson & Bergström, 2000), por lo que la función de estos volátiles se considera sólo defensiva (Farré-Armengol, 2013).

La emisión inducida de volátiles no se limita únicamente a las partes aéreas de una planta. Las raíces también liberan volátiles con una diversidad química y estructural comparable a las encontradas en las emisiones de los órganos de las plantas aéreas (Dudareva *et al.*, 2006; Hiltbold *et al.*, 2011; Turlings *et al.*, 2012). Al igual que los compuestos volátiles provenientes de las partes aéreas, los procedentes de las raíces pueden contribuir a un sistema de defensa subterráneo actuando como sustancias antimicrobianas o antiherbívoras, o atrayendo enemigos de los herbívoros que se alimentan de la raíz (Tripathi *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2004; Steeghs *et al.*, 2004; Ro *et al.*, 2006; Dudareva *et al.*, 2006).

1.1.3- *Rol de los componentes volátiles en las interacciones tritróficas*

Las interacciones tritróficas son las interacciones planta-insecto herbívoro-insecto carnívoro, sugeridas por primera vez en 1980 (Price *et al.*, 1980), las cuales ocurren muy frecuentemente en el reino vegetal. Este fenómeno ha sido descrito en el apartado 1.1.2.

1.1.4- *Rol de los componentes volátiles en las interacciones con otras plantas*

Las sustancias volátiles liberadas por las plantas infectadas con insectos herbívoros también median las interacciones planta-planta, pudiendo inducir la expresión de genes de defensa y la emisión de CVV en hojas sanas de la misma planta o de plantas vecinas no atacadas, aumentando así su atractivo a carnívoros y disminuyendo su susceptibilidad al ataque (Dicke *et al.*, 1990; Arimura *et al.*, 2000; Arimura *et al.*, 2002; 2004; Ruther & Kleier, 2005). Por ejemplo, en un estudio donde se usaron ácaros de *Tetranychus urticae* y ácaros carnívoros depredadores (*Phytoseiulus persimilis*), se demostró que no sólo la planta atacada sino también las vecinas se volvieron más atractivas a los ácaros depredadores y menos susceptibles a los ácaros de *Tetranychus urticae* (Bruin *et al.* 1992).

El mecanismo de interacción intra o inter planta mediado por CVV incluye los procesos de *elicitación* y *priming*. La *elicitación* hace referencia a un proceso de liberación de CVV como respuesta al ataque de herbívoros. Estos compuestos se denominan volátiles vegetales inducidos por herbívoros (HIPVs es la sigla por su nombre en inglés, *herbivore-induced plant volátiles*) (Lucas-Barbosa *et al.*, 2011). El *priming* o primado es la resistencia inducida por HIPVs (Heil, 2014). Consiste en la preparación de una planta sana contra un posible ataque de

un patógeno o un herbívoro basándose en las señales de los compuestos volátiles liberados a la atmósfera por las plantas atacadas, y así, las plantas que reciben las señales son capaces de responder más rápida e intensamente al ataque posterior de insectos herbívoros (Engelberth *et al.*, 2004; Kessler *et al.*, 2006).

La liberación de HIPVs se produce localmente a partir de tejidos dañados y sistémicamente en tejidos no dañados, y muestra patrones temporales distintos (Schmelz *et al.*, 2001; Arimura *et al.*, 2004; Lucas-Barbosa *et al.*, 2011; Heil, 2014). Por ejemplo, *Nicotiana tabacum* libera varios HIPVs exclusivamente en la noche. Estos compuestos nocturnamente emitidos repelen a las hembras de *Heliothis virescens*, que buscan sitios de oviposición durante el período nocturno (De Moraes *et al.*, 2001). El ritmo diurno de las emisiones volátiles se demostró a partir de estudios en hojas de algodón dañadas por el gusano del labrador (Loughrin *et al.*, 1994) y en hojas de frijol infestadas con *Spodoptera littoralis* (Arimura *et al.*, 2005). Del mismo modo, las hojas de *Populus trichocarpa* × *deltoides* atacadas por la oruga forestal y las hojas no infestadas liberaron mezclas muy similares de volátiles que consistían en (E)- β -ocimeno junto con cinco o seis compuestos mono-, sesqui- y homoterpenos, siendo la emisión máxima durante el período de luz (Arimura *et al.*, 2004). Otros HIPVs implicados en la comunicación intra e interplanta incluyen metil jasmonato (Farmer, 2001), salicilato de metilo (Shulaev *et al.*, 1997) y (Z)-3-hexenol (Farag *et al.*, 2005; Ruther & Kleier, 2005). La exposición de las plantas de maíz intactas al (Z)-3-hexenol induce la emisión de una mezcla volátil, que normalmente se libera después de la alimentación de la oruga y atrae a los enemigos naturales de los herbívoros (Ruther & Kleier, 2005).

Se han realizado numerosos estudios de *priming* mediado por volátiles (Engelberth *et al.*, 2004; Kessler *et al.*, 2006; Heil, 2014). Por ejemplo, plántulas de maíz previamente expuestas a HIPVs tales como (Z)-3-hexenal, (Z)-3-hexen-1-ol y (Z)-3-hexenil acetato de plantas atacadas, respondieron al ataque de *Spodoptera exigua* con mayor producción de ácido jasmónico y una mayor liberación de sesquiterpenos en comparación con plantas que habían sido dañadas y tratadas de manera similar pero no expuestas previamente a HIPVs (Engelberth *et al.*, 2004). De esta manera, es interesante observar que el *priming* mediado por CVV proporciona una forma diferente de responder a la amenaza de insectos, a través de la activación de procesos bioquímicos de defensa antes del inicio del ataque real en plantas receptoras de HIPVs (Engelberth *et al.*, 2004; Kessler *et al.*, 2006).

Otro rol de los CVV en las interacciones planta-planta es la alelopatía. La alelopatía del polen es un fenómeno que se ha documentado también como parte de las funciones de los componentes volátiles. Los efectos alelopáticos del polen de una especie son impedir la

germinación del polen de otras especies, lo que confiere una ventaja competitiva a las especies que los producen (Murphy, 1999).

Los volátiles liberados por las raíces en el suelo también pueden exhibir actividad alelopática al reducir la germinación y el crecimiento de plantas vecinas competitivas como se demostró para el 1,8-cineol (Romagni *et al.*, 2000; Singh *et al.*, 2002). Su efecto fitotóxico sobre la germinación y el crecimiento de las semillas es probablemente el resultado de una inhibición tanto de la síntesis de ADN nuclear como de organelas en el meristemo apical de la raíz (Nishida *et al.*, 2005), así como también de cambios en la composición de fosfolípidos y esteroides en la raíz (Zunino & Zygodlo, 2005). En contraste con las interacciones aéreas de la planta con otros organismos, la comunicación en la rizósfera y la señalización subterránea se limita probablemente a vecinos y competidores inmediatos y está restringida por la movilidad de muchos organismos del suelo y las relativamente bajas tasas de transporte de los compuestos emitidos por las raíces (Van der Putten *et al.*, 2001; Baldwin *et al.*, 2002).

1.1.5- *Rol de los compuestos volátiles en procesos de estrés abiótico*

Los procesos de estrés abiótico están mediados por procesos físicos y químicos ambientales tales como sequía, salinidad, calor, frío, luz UV-B, polución del aire, metales pesados, deficiencia nutricional y heridas mecánicas (Nakabayashi & Saito, 2015).

Además de la implicación de los CVV en los procesos bióticos, los isoprenoides volátiles son capaces de proteger a las plantas contra el daño por calor, aumentando la termotolerancia de las plantas frente a temperaturas elevadas, de modo de poder mantener las tasas fotosintéticas en los niveles necesarios (Loreto *et al.*, 1998; Sharkey *et al.*, 2001; Copolovici *et al.*, 2005; Penuelas *et al.*, 2005). Por ejemplo, el bloqueo de la emisión de monoterpenos en hojas de *Quercus ilex* (L.) con fosmidomicina, un inhibidor específico de la vía biosintética plastidial isoprenoide, dio como resultado la disminución de la termotolerancia fotosintética. Sin embargo, la fumigación con concentraciones relativamente bajas de monoterpenos, restauró parcialmente la resistencia al estrés térmico (Copolovici *et al.*, 2005). De forma similar, la fumigación con isopreno exógeno de hojas de *Quercus rubra* y *Pueraria lobata* alimentadas con fosmidomicina aumentó la capacidad del aparato fotosintético para recuperarse de una breve exposición a altas temperaturas (Sharkey *et al.*, 2001). Estos resultados sugieren que la tolerancia al calor de las plantas que no emiten monoterpenos e isoprenos puede ser mejorada significativamente mediante la emisión de volátiles por parte de especies emisoras que crecen

en las cercanías durante los días cálidos y sin viento (Copolovici *et al.*, 2005). Aunque el mecanismo exacto por el cual el isopreno o los monoterpenos confieren termotolerancia no se conoce, se ha propuesto que a altas temperatura, las membranas tilacoides se vuelven permeables (Pastenes & Horton, 1996; Bukhov *et al.*, 1999) y el isopreno podría mejorar las interacciones hidrofóbicas dentro de dichas membranas durante un corto tiempo. El isopreno es además, capaz de potenciar las interacciones hidrofóbicas dentro de grandes complejos de proteínas unidos a membrana (por ejemplo, fotosistema II), evitando así la fragmentación de estos complejos proteicos (Dudareva *et al.*, 2006).

Los isoprenoides volátiles también pueden servir como antioxidantes para proteger a las plantas contra una serie de procesos incluyendo el estrés oxidativo inducido por el ozono (Affek & Yakir, 2002) y la acumulación de oxígeno (Loreto *et al.*, 2001; Loreto & Velikova, 2001). Por ejemplo, cuando la emisión de monoterpenos fue inhibida por la fosmidomicina, las hojas de *Quercus ilex* se volvieron susceptibles al ozono, resultando en una reducción rápida y significativa de la fotosíntesis, acumulación de especies reactivas de oxígeno como peróxido de hidrógeno y peroxidación de membranas monitorizadas por concentraciones crecientes de malonildialdehído (Loreto *et al.*, 2004). Todos estos síntomas también se han observado después de la inhibición de la biosíntesis de isopreno en las plantas que lo emiten (Loreto & Velikova, 2001), lo que demuestra la importancia de la emisión de isopreno en la protección de las hojas contra el daño oxidativo. Por este motivo, es posible sospechar que el isopreno puede tener una propiedad de extinción directa del ozono en lugar de inducir resistencia a nivel de membrana (Loreto *et al.*, 2001).

La figura 1.1 muestra un resumen de las funciones de los componentes volátiles vegetales. En ella se pueden observar:

Interacciones entre plantas y animales: atracción de polinizadores y dispersadores de semillas, atracción/repelencia de herbívoros y atracción de enemigos naturales de herbívoros atacantes.

Interacciones planta-planta: inducción de respuestas de defensa en hojas sanas y no dañadas de la misma planta o en las plantas no atacadas vecinas.

Interacciones bajo el suelo: estas interacciones incluyen actividad alelopática sobre la germinación y el crecimiento de plantas vecinas competitivas. Los volátiles liberados de los órganos reproductores y las raíces también tienen actividad antimicrobiana, protegiendo así las plantas del ataque de patógenos.

Interacciones abióticas: el isopreno confiere fotoprotección y termotolerancia.

La tabla 1.1 se presentan diferentes funciones atribuidas a algunos CVV en interacciones bióticas y abióticas, además de algunos responsables de aromas y sabores naturales (Dicke *et al.*, 2009; Hassan *et al.*, 2015).

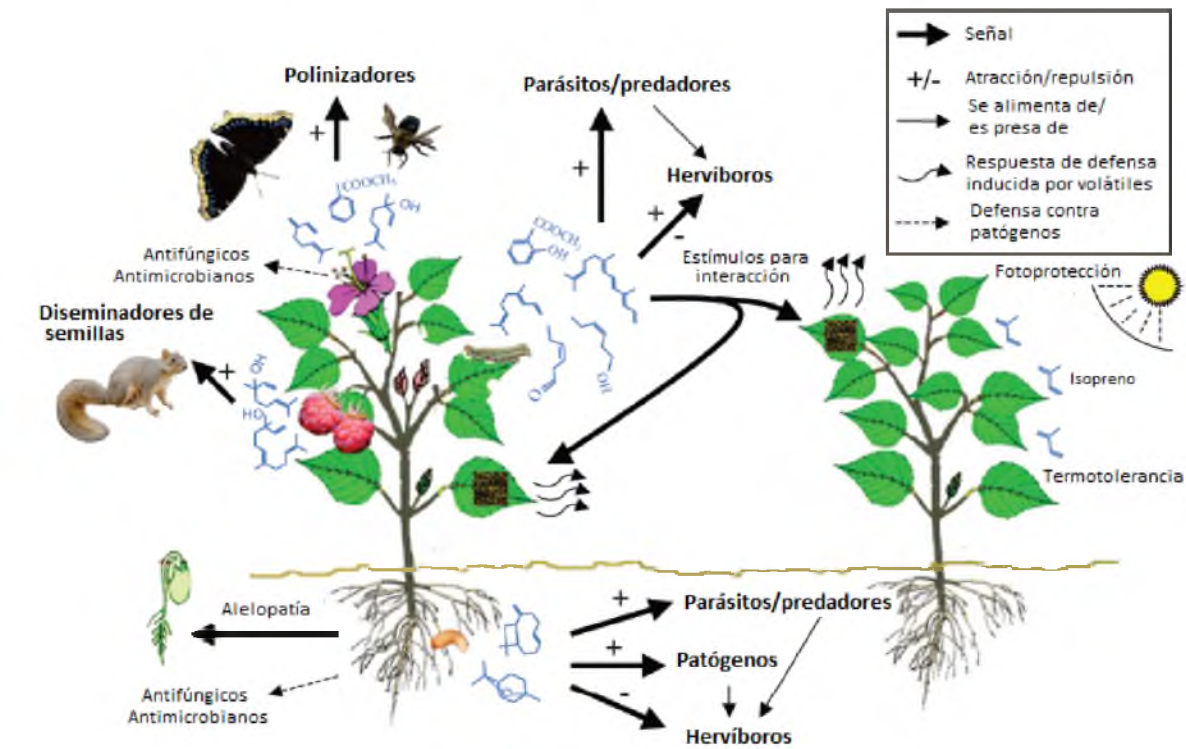


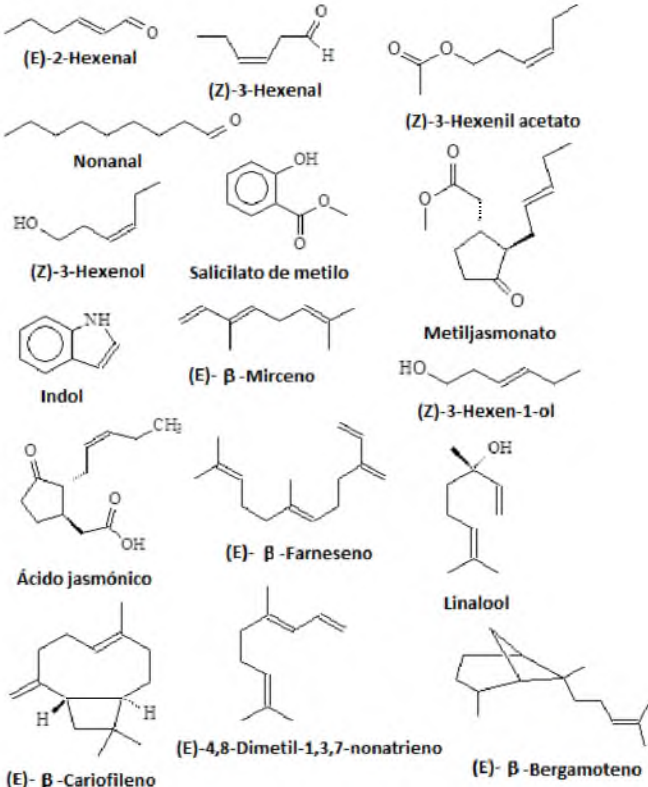
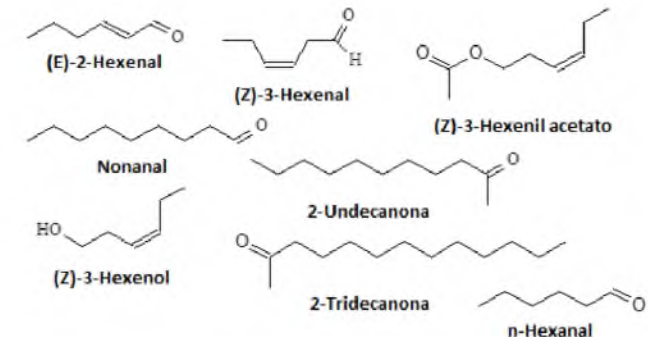
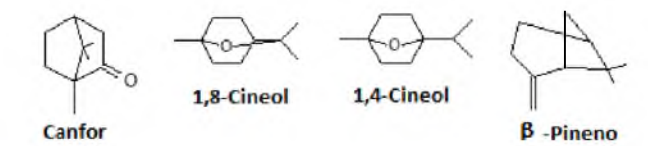

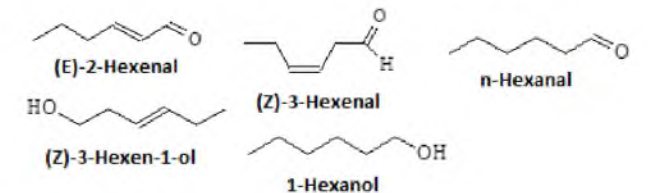
Figura 1.1. Interacciones de las plantas con el medio ambiente circundante mediadas por componentes volátiles (Dudareva *et al.*, 2006).

Tabla 1.1. Funciones biológicas de algunos compuestos orgánicos volátiles vegetales.

Función biológica	Compuestos ¹		
Defensa contra herbívoros			

¹ Fuente de las estructuras químicas: Base de datos NIST: <http://webbook.nist.gov/chemistry/>

Tabla 1.1. Continuación.

Función biológica	Compuestos ²
Elicitación y priming	
	
Aleopatía	
Defensa contra estrés abiótico	
Aroma y sabor	

² Fuente de las estructuras químicas: Base de datos NIST: <http://webbook.nist.gov/chemistry/>

1.2- Biosíntesis de los compuestos volátiles vegetales

Los CVV son producidos principalmente en las flores, aunque también se encuentran en los frutos, tallos, hojas y raíz. Su producción ocurre en las mismas rutas biosintéticas de metabolitos secundarios no volátiles, lo que explica su diversidad (Marín-Loaiza & Céspedes, 2007).

La biosíntesis de CVV depende de la disponibilidad de carbono, nitrógeno y oxígeno, así como también de la energía provista por el metabolismo primario (Dudareva *et al.*, 2013). Por lo tanto, la disponibilidad de estos elementos tiene un impacto importante en la concentración de cualquier metabolito secundario, incluyendo los volátiles, demostrando el alto grado de conectividad entre el metabolismo primario y secundario (Dudareva *et al.*, 2006; Dudareva *et al.*, 2013). La figura 1.2 muestra un esquema de los elementos básicos del metabolismo primario y su conexión con el metabolismo secundario.

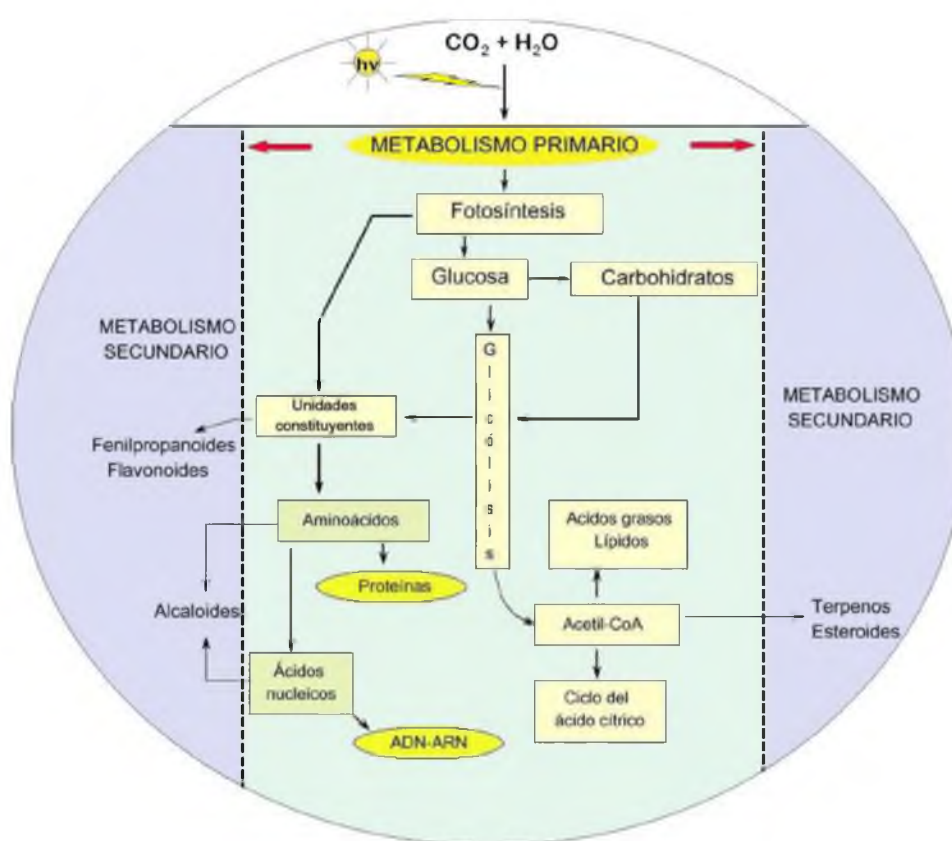


Figura 1.2. Elementos básicos del metabolismo primario y su relación con el metabolismo secundario de plantas (Ávalos & Perez-Urria Carril, 2011).

La biosíntesis de la amplia gama de diferentes CVV se ramifica a partir de sólo unas pocas vías metabólicas primarias (Dudareva *et al.*, 2013). La figura 1.3 muestra una vista general de la biosíntesis de CVV. Los precursores que se originan del metabolismo primario están representados en el cuadro azul. Las cuatro vías biosintéticas principales de compuestos volátiles, a saber, son: vía de shikimato/fenilalanina, vía de ácido mevalónico (MVA), vía de fosfato de metileritritol (MEP) y vía de lipoxigenasa (LOX), las cuales conducen a la emisión de bencenoides, fenilpropanoides, sesquiterpenos, monoterpenos, hemiterpenos, diterpenos, compuestos derivados de carotenoides, volátiles de hojas verdes (GLV) y metiljasmonato (Dudareva *et al.*, 2013). Las flechas apiladas en la figura ilustran la participación de múltiples reacciones enzimáticas. Los compuestos volátiles se destacan con una nube púrpura como fondo.

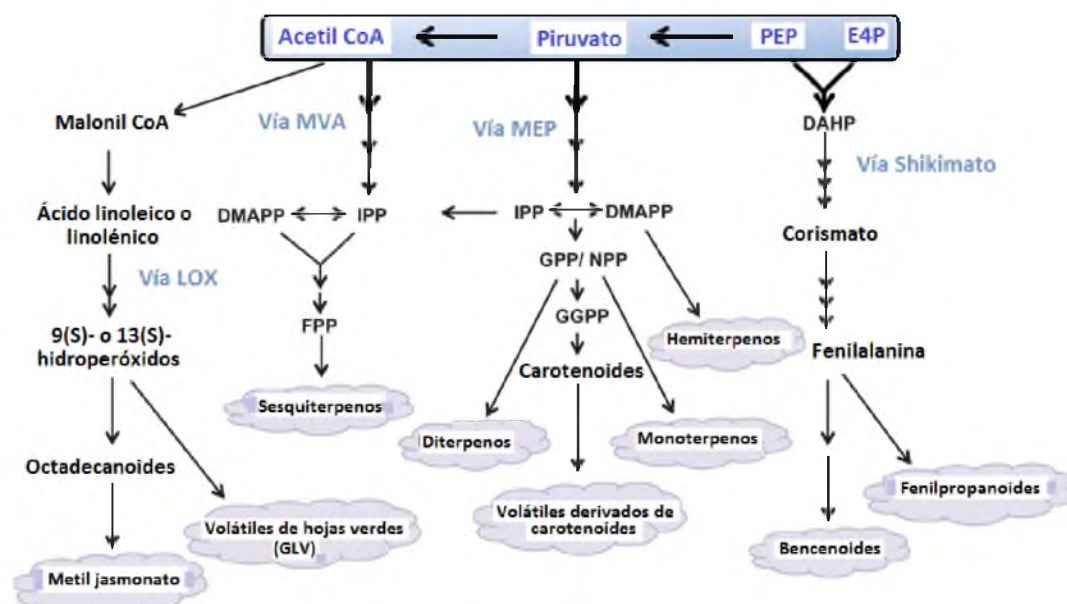


Figura 1.3. Vista general de las vías biosintéticas que conducen a la emisión de compuestos orgánicos volátiles. Abreviaturas: MVA, ácido mevalónico; MEP, fosfato de metileritritol; LOX, lipoxigenasa; DAHP, 3-desoxi-D-arabinoheptulosonato-7-fosfato; DMAPP, dimetilalilpirofosfato; E4P, eritrosa-4-fosfato; FPP, farnesilpirofosfato; GGPP, geranilgeranilpirofosfato; GPP, geranilpirofosfato; IPP, isopentenilpirofosfato; NPP, nerilpirofosfato; PEP, fosfoenolpiruvato (Dudareva *et al.*, 2013).

1.2.1- Biosíntesis de terpenoides

Los terpenoides constituyen la clase más grande y diversa de metabolitos secundarios producidos en las plantas, con numerosos constituyentes volátiles, los cuales derivan de dos precursores comunes de cinco átomos de carbono, el isopentenildifosfato (IPP) y su isómero alílico, el dimetilalilpirofosfato (DMAPP) (McGarvey & Croteau, 1995). En las plantas, hay

dos vías independientes que ocurren en compartimientos separados; la del ácido mevalónico (MVA) que ocurre en el citosol, y la del fosfato de metileritritol (MEP) que ocurre en el cloroplasto (Dudareva *et al.*, 2013). Estas vías son responsables de la formación de las unidades isopreno (C₅) (Figura 1.4).

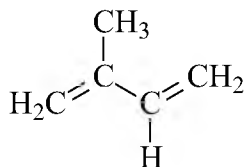


Figura 1.4. Unidad de isopreno (C₅).

La vía MVA da lugar a sesquiterpenos volátiles (3 unidades de isopreno, C₁₅), mientras que la vía MEP proporciona precursores de hemiterpenos volátiles (C₅), monoterpenos (2 unidades de isopreno, C₁₀) y diterpenos (4 unidades de isopreno, C₂₀). Se considera que la vía del MEP es exclusivamente plastidial, ya que, basados en pruebas experimentales y predicciones de su localización subcelular, el conjunto completo de sus enzimas existe sólo en los cloroplastos (Hsieh *et al.*, 2008). Por el contrario, la localización subcelular de la vía MVA no es tan clara. Históricamente, esta vía se conoce como citosólica, sin embargo, nuevas pruebas sugieren que la vía del MVA se distribuye entre el citosol, el retículo endoplásmico y los peroxisomas (Simkin *et al.*, 2011; Pulido *et al.*, 2012).

La vía del MVA consta de seis reacciones enzimáticas y se inicia por una condensación escalonada de tres moléculas de acetil-CoA a 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA, que experimenta una reducción a MVA seguida de dos fosforilaciones posteriores y una etapa de descarboxilación/eliminación con formación de IPP como producto final. Hasta la fecha, todavía no está claro qué grupo subcelular de acetil-CoA se utiliza para la biosíntesis de terpenoides, ya que el acetil-CoA no puede cruzar fácilmente las membranas, y las reservas están en los cloroplastos, peroxisomas, mitocondrias, citosol y núcleo (Dudareva *et al.*, 2013). El genoma de *Arabidopsis* contiene dos genes que codifican la acetoacetil-CoA tiolasa (AACT), la cual cataliza el primer paso en la vía MVA (Ahumada *et al.*, 2008) y, basado en el análisis del proteoma, se localiza en los peroxisomas (Reumann *et al.*, 2007).

La ruta MEP implica siete etapas enzimáticas y comienza con la condensación de D-gliceraldehído-3-fosfato (GAP) y piruvato para producir 1-desoxi-D-xilulosa-5-fosfato (DXP), que luego se somete a isomerización/reducción con formación del intermediario característico de la vía, MEP. Se requieren cinco pasos consecutivos para convertir el MEP en

IPP y DMAPP. La ruta del MEP se basa en el metabolismo primario para el suministro de piruvato y GAP, siendo este último derivado tanto de la glicólisis como de la vía de pentosa fosfato (PPP). Hasta la fecha, el origen de piruvato en los cloroplastos no se entiende completamente, ya que los plástidos tienen actividades bajas de las enzimas glicolíticas claves, fosfoglicerato mutasa y enolasa (Andriotis *et al.*, 2010; Bayer *et al.*, 2011), y podría no ser capaz de sostener la alta demanda de piruvato para la biosíntesis de isoprenoides. De hecho, la biosíntesis de IPP localizada en cloroplastos se vio afectada en mutantes de *Arabidopsis thaliana* que carecían de un transportador de piruvato que suministra piruvato a la demanda citosólica de la vía MEP (Furumoto *et al.*, 2011).

Tanto IPP como DMAPP son sustratos para preniltransferasas de cadena corta, que producen precursores de prenil fosfato, geranilpirofosfato (GPP), farnesilpirofosfato (FPP) y geranilgeranilpirofosfato (GGPP), para una gran familia de terpenos sintetasas/ciclasas (TPSs) (Cane, 1999; Wise & Croteau, 1999). Mientras que la vía MVA produce sólo IPP, la vía MEP da como resultado la síntesis tanto de IPP como de DMAPP en una proporción de 6:1 (Rohdich *et al.*, 2003). Por lo tanto, ambas vías dependen de la enzima isopentenil difosfato isomerasa (IDI), que reversiblemente convierte IPP a DMAPP (Nakamura *et al.*, 2001), controlando así el equilibrio entre ellos.

El IPP, el DMAPP y los prenil fosfatos cortos (GPP y FPP) facilitan el cruce metabólico entre las vías MVA y las vías MEP separadas en distintos compartimentos celulares actuando como metabolitos de conexión (Nabeta *et al.*, 1997; Hemmerlin *et al.*, 2003; Wu *et al.*, 2006; Orlova *et al.*, 2009). El tráfico de estos compuestos a través de la membrana de envoltura interna de los cloroplastos estaría mediado por un transportador de metabolitos, pero aún no ha sido identificado (Bick & Lange, 2003; Flügge & Gao, 2005). Tal conectividad de las vías biosintéticas isoprenoides hace pensar que la vía MEP, a menudo con un flujo más alto de carbono que la vía MVA, se lleve a cabo en el citosol (Laule *et al.*, 2003; Ward *et al.*, 2011). La contribución de estas vías a la biosíntesis terpenoide es específica de especies y/o órganos (Dudareva *et al.*, 2013).

A pesar de la presencia de IPP y DMAPP en varios compartimentos, la biosíntesis de intermediarios de prenil fosfatos es específica de cada compartimento y depende de la localización subcelular de preniltransferasas de cadena corta. En el citosol, la condensación secuencial de cabeza-cola de dos moléculas de IPP con una molécula de DMAPP catalizada por FPP sintetasa da lugar a FPP, el precursor de sesquiterpenos volátiles. En plastidios, las GPP y GGPP sintetasas son responsables de la condensación de cabeza-cola de una molécula de DMAPP con una o tres moléculas de IPP para formar GPP y GGPP, respectivamente, los

precursores correspondientes de mono y diterpenos (Dudareva *et al.*, 2013). La figura 1.5 muestra el acoplamiento cabeza-cola de las unidades isoprénicas.

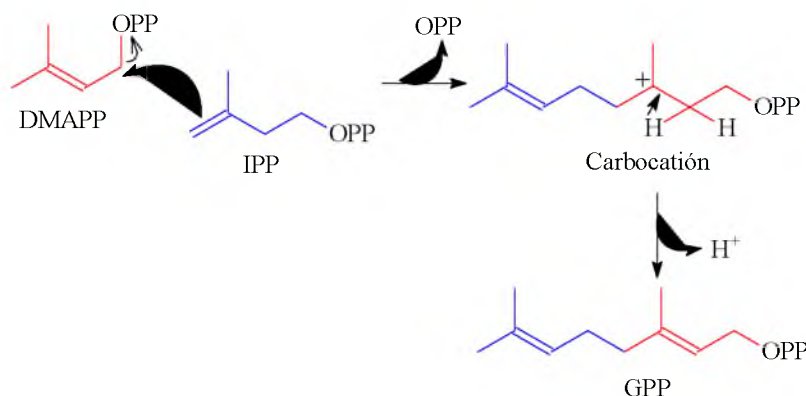


Figura 1.5. Acoplamiento cabeza-cola de dos unidades isoprénicas.

Además de una amplia gama de terpenoides volátiles formados directamente por TPSs, la diversidad de terpenoides se incrementa adicionalmente por otras enzimas que son capaces de modificar los productos mediante hidroxilación, deshidrogenación, acilación u otras reacciones, aumentando así su volatilidad y alterando sus propiedades olfativas (Dudareva *et al.*, 2004). Las plantas también producen terpenoides volátiles irregulares con esqueletos de carbono que van desde C₈ a C₁₈, que se originan a partir de carotenoides a través de modificaciones de tres pasos, incluyendo una escisión inicial por la enzima dioxigenasa, seguida de transformación enzimática y conversión catalizada por ácido a compuestos volátiles (Winterhalter & Rouseff, 2001). En algunos casos, incluyendo *Arabidopsis*, tomate, petunia y melón, el paso de escisión por dioxigenasa en sí puede producir CVV, tales como α - y β -ionona, geranilacetona y pseudoionona, a partir de una serie de pigmentos carotenoides (Simkin *et al.*, 2004; Ibdah *et al.*, 2006). Los homoterpenos irregulares acíclicos C₁₁- y C₁₆, 4,8-dimetilnona-1,3,7-trieno (DMNT) y 4,8,12-trimetiltrideca-1,3,7,11-tetraeno (TMTT), se derivan de FPP y GGPP, respectivamente. Su biosíntesis se realiza a través de dos etapas enzimáticas, que produce precursores terciarios de alcoholes C₁₅ y C₂₀, (E)-nerolidol y (E,E)-geranil linalool, respectivamente, seguido de una degradación oxidativa catalizada por una monooxigenasa citocromo P450 (Tholl *et al.*, 2011).

La figura 1.6 muestra la biosíntesis de volátiles terpenoides. La comunicación cruzada entre ambas vías es facilitada por la exportación de pirofosfato de isopentenilo (IPP) desde el plástido hasta el citosol. Las flechas sólidas representan etapas establecidas de biosíntesis, mientras que las flechas punteadas representan reacciones hipotéticas (Dudareva *et al.*, 2013). Los compuestos terpenoides volátiles se destacan con una nube púrpura como fondo. Las

enzimas mostradas en azul presentan localización peroxisomal, mientras que la de color rojo está localizada en el retículo endoplasmático (RE).

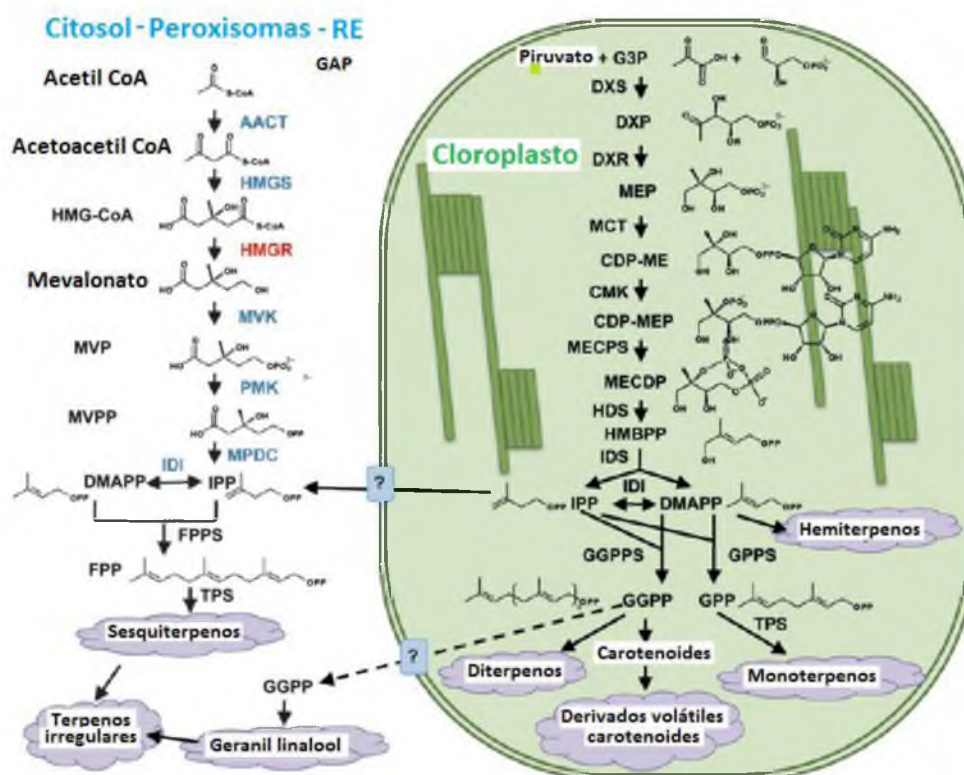


Figura 1.6. Síntesis de compuestos orgánicos volátiles terpenoides. Los compuestos volátiles terpenoides son sintetizados por las vías del ácido mevalónico citosólico (MVA) y fosfato de metileritritol plastificado (MEP), las primeras dando lugar a sesquiterpenos, terpenos irregulares y geranilalol, y los últimos a monoterpenos, hemiterpenos, diterpenos y derivados volátiles de carotenoides. Abreviaturas: AACT, acetyl-CoA acetyltransferasa; CDP - ME, 4-difosfocitidil-2-C-metil-D-eritritol; CDP - MEP, CDP-ME 2-fosfato; CMK, 4-(citidina-5'-difosfo)-2-C-metil-D-eritritol quinasa; DMAPP, dimetilalilpirofosfato; DXP, 1-desoxi-D-xilulosa-5- fosfato; DXS, DXP sintasa; DXR, 1-desoxi-D- xilulosa-5-fosfato reductoisomerasa; FPP, farnesilpirofosfato; FPPS, FPP sintasa; G3P, gliceraldehído-3-fosfato; GGPP, geranilgeranilpirofosfato; GGPPS, GGPP sintetasa; GPP, geranilpirofosfato; GPPS, GPP sintasa; HDS, 4-hidroxi-3-metilbut-2-en-1-il difosfato sintasa; HMBPP, difosfato de (E)-4-hidroxi-3-metilbut-2-en-1-il; HMG - CoA, hidroximetilglutaril-CoA; HMGR, HMG-CoA reductasa; HMGS, HMG-CoA sintasa; IDI, isopentenil pirofosfato isomerasa; IDS, isopentenil difosfato sintasa; IPP, isopentenilpirofosfato; MCT, 2-C-metil-D-eritritol-4-fosfato citidililtransferasa; MECPD, 2-C-metil-D- eritritol-2,4-ciclodifosfato; MECPS, MECPD sintasa; MVK, mevalonato quinasa; MPDC, mevalonato difosfato descarboxilasa; MVP, mevalonato-5-fosfato; MVPP, mevalonato-5-pirofosfato; PMK, fosfomevalonato quinasa; TPS, terpeno sintetasa; RE, retículo endoplasmático (Dudareva *et al.*, 2013).

1.2.2- Biosíntesis de compuestos bencenoides y fenilpropanoides

La segunda clase más grande de CVV comprende compuestos fenilpropanoides y bencenoides, que se originan a partir del aminoácido aromático L-fenilalanina (FA). Siete reacciones enzimáticas de la vía shikimato y tres de la vía de los arogenatos vinculan el

metabolismo central del carbono con FA. Los precursores inmediatos de la vía del shikimato, fosfoenolpiruvato (PEP) y D-eritrosa-4-fosfato (E4P), derivan de la glucólisis y de PPP, respectivamente. La misma vía provee los precursores para la vía MEP, y por lo tanto ésta tiene que competir por la asignación de carbono con la vía shikimato, especialmente cuando el 30% del carbono fijado fotosintéticamente se dirige a FA, en gran parte para producir lignina. La primera enzima en la vía shikimato, la 3-desoxi-D-arabino-heptulosonato-7-fosfato sintetasa (DAHP sintetasa), juega un papel clave en el control del flujo de carbono. Sin embargo, los mecanismos moleculares involucrados en esta regulación siguen siendo desconocidos (Dudareva *et al.*, 2013).

Mientras que la biosíntesis de FA tiene lugar en los cloroplastos, su conversión adicional a compuestos volátiles se produce fuera de estas organelas. El primer paso comprometido en la biosíntesis de la mayoría de fenilpropanoides y benzoides es catalizado por una enzima bien conocida y ampliamente distribuida, la L-fenilalanina amonio liasa (PAL), que desamina la fenilalanina y la convierte en ácido *trans*-cinámico (CA). La formación de los bencenoides (C₆-C₁) a partir del CA requiere la eliminación de dos átomos de carbono de la cadena y se ha demostrado que procede a través de una vía β -oxidativa, una vía no β -oxidativa (independiente de CoA) o una combinación de ambas (Dudareva *et al.*, 2013). La ruta β -oxidativa sólo se ha elucidado recientemente y parece ser análoga a la que opera en el catabolismo de ácidos grasos y ciertos aminoácidos de cadena ramificada. Esta vía comienza con la activación de CA a su CoA tioéster, que experimenta hidratación, oxidación y escisión del β -ceto-tioéster, dando como resultado la formación de benzoil-CoA. La localización peroxisomal de la vía β -oxidativa plantea la cuestión de la exportación de benzoil-CoA al citosol para la biosíntesis de bencilbenzoato y feniletilbenzoato (Dudareva *et al.*, 2013).

La vía no β -oxidativa alternativa procede a través del benzaldehído como intermediario clave seguido por su oxidación a ácido benzoico. Mientras que la benzaldehído deshidrogenasa dependiente de NAD⁺ que convierte el benzaldehído en ácido benzoico se aisló y caracterizó (Long *et al.*, 2009), las etapas bioquímicas que conducen a la formación de benzaldehído están todavía en cuestión (Dudareva *et al.*, 2013). Durante la última década, se han logrado progresos significativos en el descubrimiento de enzimas y genes implicados en las etapas finales de la formación de los bencenoides volátiles (Dudareva *et al.*, 2013).

Los fenilpropenos volátiles (C₆-C₃), como eugenol, isoeugenol, metileugenol, isometileugenol, chavicol y metilchavicol, comparten los pasos biosintéticos iniciales con la vía bioquímica de la lignina hasta la etapa de fenilpropenol (monolignol), que luego requieren dos reacciones enzimáticas para eliminar la funcionalidad del oxígeno en la posición C-9. El

alcohol coniferílico se convierte primero en acetato de coniferilo por acción de la enzima coniferil alcohol acetiltransferasa antes de su reducción a eugenol e isoeugenol por acción de las enzimas eugenol sintetasa e isoeugenol sintetasa, respectivamente. Similarmente, el acetato de cumarilo sirve como precursor biosintético del chavicol en albahaca (Vassao *et al.*, 2006). A menudo, el eugenol, el isoeugenol y el chavicol experimentan metilación adicional y requieren enzimas o-metiltransferasas para la producción posterior de metil eugenol, isomethyl eugenol y metil chavicol (Dudareva *et al.*, 2013).

En contraste con los bencenoides y fenilpropanos, la biosíntesis de compuestos volátiles relacionados a fenilpropanoides (C₆-C₂), tales como fenilacetaldehído y 2-feniletanol, no ocurre a través de CA y compite con PAL para la utilización de FA. En petunia y pétalos de rosa, el fenilacetaldehído se produce directamente a partir de FA a través de una combinación de la reacción de descarboxilación de amina y de la reacción de oxidación catalizada por fenilacetaldehído sintetasa (Kaminaga *et al.*, 2006; Farhi *et al.*, 2010), mientras que en el tomate, su biosíntesis se produce a través de dos vías separadas: FA se convierte primero en feniletilamina por acción de la enzima aminoácido aromático decarboxilasa y requiere la acción de una aminooxidasa, deshidrogenasa o transaminasa para la formación de fenilacetaldehído (Tieman *et al.*, 2006). Recientemente, se descubrió una tercera ruta enzimática en el melón (*Cucumis melo* L.), donde FA se transamina primero a su correspondiente α -cetoácido, fenilpiruvato, seguido de posterior descarboxilación a fenilacetaldehído (Gonda *et al.*, 2010).

La figura 1.7 muestra la biosíntesis de bencenoides y fenilpropanoides. Los CVV bencenoides y fenilpropanoides derivan invariablemente de la FA precursora común, que se sintetiza en el plástido a través de las vías biosintéticas shikimato/fenilalanina. Una vía β -oxidativa peroxisomal (fondo azul) y una ruta no β -oxidativa son responsables de la formación de ácido benzoico, un precursor central de varios volátiles bencenoides. Las flechas sólidas indican pasos bioquímicos establecidos, mientras que los pasos hipotéticos están representados por flechas en líneas de puntos. Las flechas apiladas ilustran la participación de múltiples reacciones enzimáticas. Los compuestos de bencenoides/fenilpropanoides volátiles se destacan con un fondo púrpura.

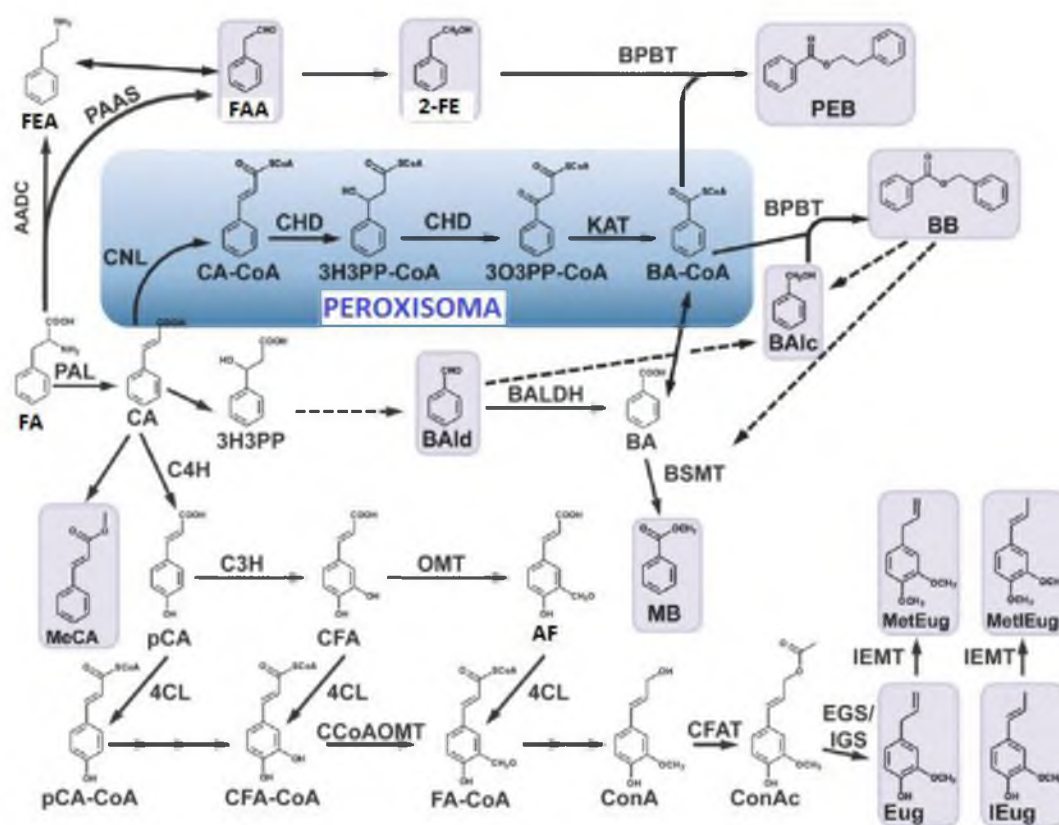


Figura 1.7. Síntesis de compuestos orgánicos volátiles benzenoides y fenilpropanoides. Abreviaturas: AADC, aminoácido aromático decarboxilasa; BA, ácido benzoico; BA-CoA, benzil-CoA; BAIc, alcohol bencilico; BALd, benzaldehído; BALDH, benzaldehído deshidrogenasa; BB, bencilbenzoato; BPBT, benzil-CoA bencilalcohol-2-feniletanol benziltransferasa; BSMT, ácido benzoico/ácido salicílico carboxil metiltransferasa; CA, ácido *trans*-cinámico; CA-CoA, cinamil-CoA; CFA, ácido cafeico; CFA-CoA, cafeil-CoA; CFAT, alcohol coniferílico acetatiltransferasa; C3H, p-cumarato-3-hidroxilasa; C4H, cinamato-4-hidroxilasa; CCoAOMT, cafeil-CoA 3-o-metiltransferasa; ConA, alcohol coniferílico; ConAc, acetato de coniferilo; 4CL, 4-cumaril-CoA ligasa; CNL, cinamil-CoA ligasa; EGS, eugenol sintetasa; Eug, eugenol; AF, ácido ferúlico; FA-CoA, ferulil-CoA; IEug, isoeugenol; IEMT, (iso)eugenol-o-metiltransferasa; IGS, isoeugenol sintetasa; 3H3PP, ácido 3-hidroxi-3-fenilpropiónico; 3H3PP-CoA, 3-hidroxi-3-fenilpropionil-CoA; KAT, 3-cetoacil-CoA tiolasa; MeCA, metilcinamato; MB, metilbenzoato; 3O3PP-CoA, 3-oxo-3-fenilpropionil-CoA; OMT, o-metiltransferasa; PAAS, fenilacetaldéhid sintetasa; PAL, fenilalanina amonio liasa; pCA, ácido p-cumárico; PCA-CoA, p-cumaril-CoA; PEB, feniletilbenzoato; FAA, fenilacetaldéhid; FA, L-fenilalanina; 2-FE, 2-feniletanol; FEA, feniletilamina (Dudareva *et al.*, 2013).

1.2.3- Biosíntesis de compuestos volátiles derivados de ácidos grasos

La biosíntesis de compuestos volátiles derivados de ácidos grasos es conocida como la vía de los ácidos grasos/lipooxigenasa (Paré & Tumlinson, 1997) o vía de los volátiles de hojas verdes que dan el olor característico a éstas (en inglés GLVs, green leaf volatiles). Esta vía produce derivados de ácidos grasos insaturados C₁₈, linoleicos o linolénicos tales como 1-hexanal, *cis*-3-hexenol, nonanal y jasmonato de metilo (Dudareva *et al.*, 2013).

La biosíntesis de estos derivados de ácidos grasos requiere de un pool plastídico de acetil-CoA generado a partir de piruvato, producto final de la glucólisis. Después de entrar en la vía de la lipoxigenasa (LOX), los ácidos grasos insaturados sufren oxigenación estereoespecífica para formar intermediarios 9-hidroperoxi y 13-hidroperoxi, que se metabolizan adicionalmente a través de las dos ramas de la vía LOX produciendo CVV. La rama aleno óxido sintetasa utiliza sólo el intermediario 13-hidroperoxi y conduce a la formación de ácido jasmónico (JA), que a su vez se convierte en metil jasmonato por ácido jasmónico carboxilmetiltransferasa. Por el contrario, la rama hidroperóxido-liasa convierte ambos tipos de hidroperóxidos derivados de ácido graso en aldehídos C₆ y C₉, que a menudo se reducen a alcoholes por la acción de enzimas alcohol deshidrogenasas, seguido por conversión adicional a sus ésteres. Estos aldehídos y alcoholes C₆ y C₉ saturados e insaturados, se sintetizan generalmente en órganos verdes de plantas en respuesta a heridas, pero también en frutas y verduras (Dudareva *et al.*, 2013).

La figura 1.8 muestra un esquema de la síntesis de CVV derivados de ácidos grasos. Las flechas apiladas ilustran la participación de múltiples reacciones enzimáticas. Los compuestos volátiles se destacan con un fondo de color, con GLVs mostrados en verde.

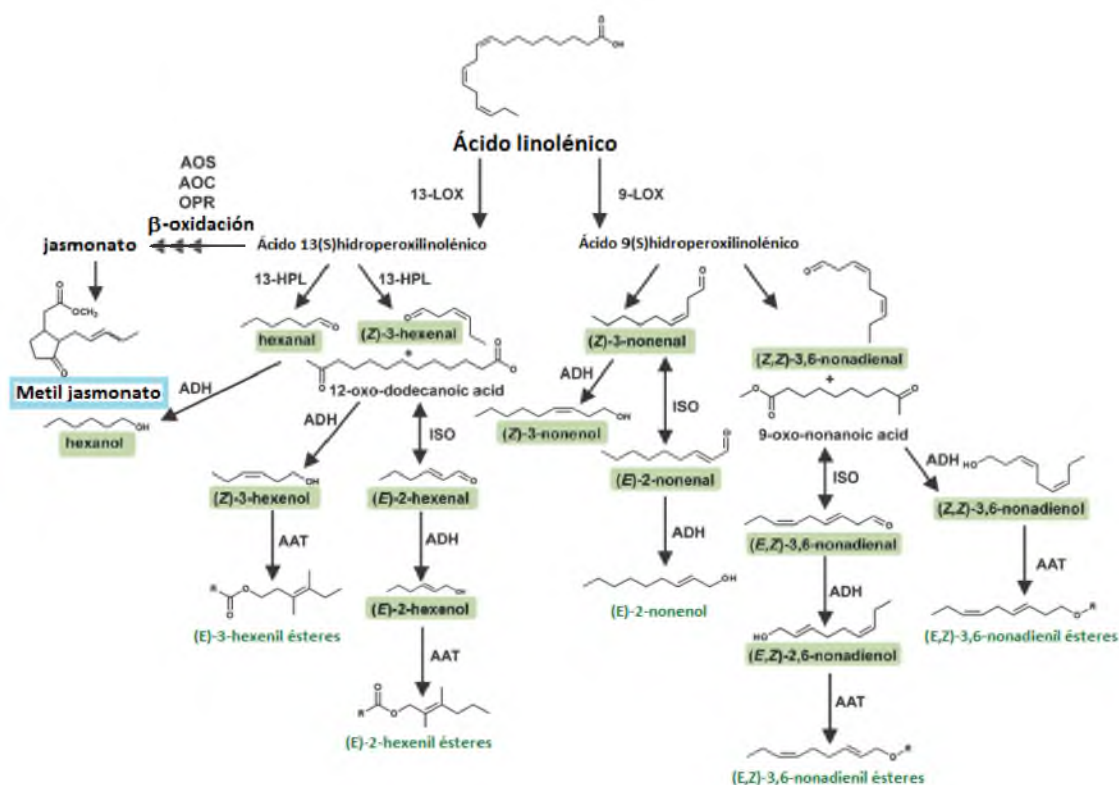


Figura 1.8. Síntesis de compuestos orgánicos volátiles derivados de ácidos grasos y volátiles de hojas verdes (GLVs). Abreviaturas: AAT, alcohol aciltransferasa; ADH, alcohol deshidrogenasa; AOC, aleno óxido ciclaza; AOS, aleno óxido sintetasa; 9-HPL, 9-hidroperóxido liasa; 13-HPL, 13-hidroperóxido liasa; ISO, isomerasa; 9-LOX, 9-lipoxigenasa; 13-LOX, 13-lipoxigenasa; OPR, 12-oxofitodienoato reductasa (Dudareva *et al.*, 2013).

1.2.4- *Biosíntesis de compuestos volátiles derivados de aminoácidos de cadena ramificada*

Numerosos compuestos volátiles, especialmente aquellos muy abundantes en aromas florales y de frutas, se derivan de aminoácidos como alanina, valina, leucina, isoleucina y metionina, o intermediarios de sus biosíntesis, y contienen nitrógeno y azufre (Dudareva *et al.*, 2013). Se cree que la biosíntesis de estos CVV derivados de aminoácidos procede de una manera similar a la encontrada en bacterias o levaduras (Dickinson *et al.*, 2000; Beck *et al.*, 2002; Tavaría *et al.*, 2002), donde estas vías han sido estudiadas más ampliamente. Como en los microorganismos, los aminoácidos experimentan una desaminación o transaminación inicial catalizada por las aminotransferasas, dando lugar a la formación del correspondiente α -acetoácido (Gonda *et al.*, 2010). Estos α -cetoácidos pueden someterse luego a descarboxilación, seguida de reducciones, oxidaciones y/o esterificaciones, formando aldehídos, ácidos, alcoholes y ésteres (Reineccius, 2006). Los aminoácidos también pueden ser precursores de acil-CoA, que se utiliza en las reacciones de esterificación de alcohol catalizadas por enzimas alcohol aciltransferasas (Beekwilder *et al.*, 2004; Gonzalez *et al.*, 2009). Un ejemplo de este grupo de compuestos volátiles es el indol (Figura 1.9), biosintetizado en maíz por la escisión del fosfato de indol-3-glicerol, un intermediario en la biosíntesis de triptófano (Koeduka *et al.*, 2006).

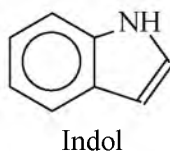


Figura 1.9. Estructura química de indol.

La figura 1.10 muestra un esquema de la síntesis de compuestos orgánicos volátiles derivados de aminoácidos de cadena ramificada. En la tabla 1.2 se muestran ejemplos de CVV por grupo químico de biosíntesis.

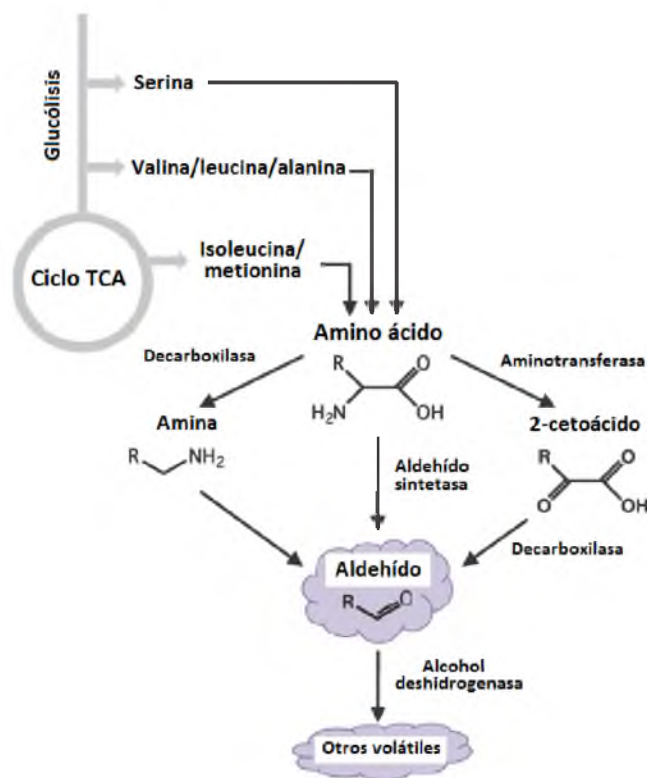
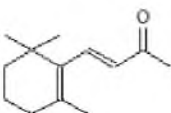
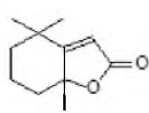
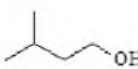
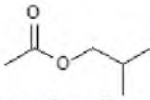




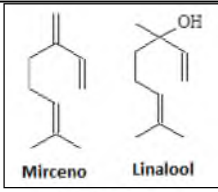
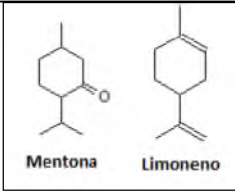
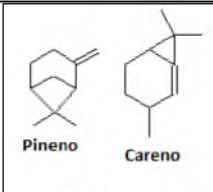
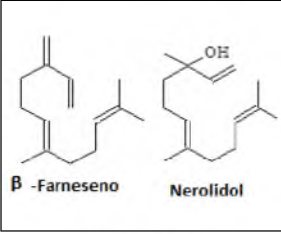
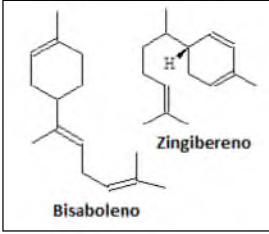
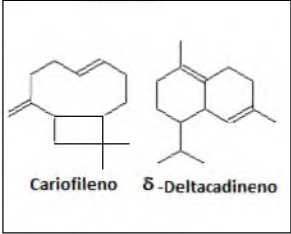
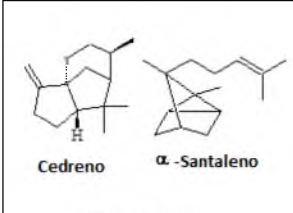
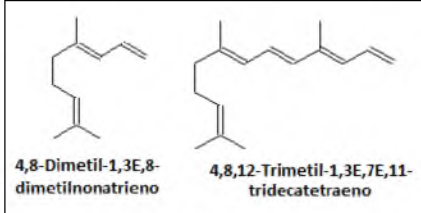
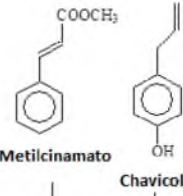
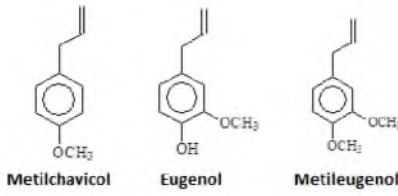
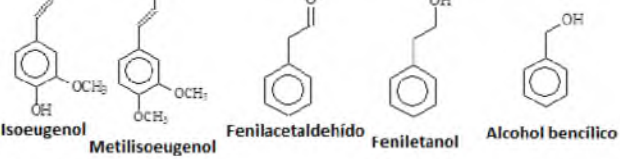
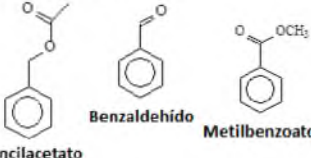
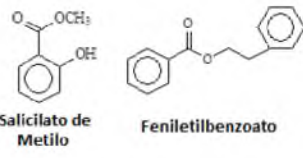
Figura 1.10. Síntesis de compuestos orgánicos volátiles derivados de aminoácidos de cadena ramificada. TCA, ácido tricarboxílico (Dudareva *et al.*, 2013).

Tabla 1.2. Ejemplos de estructuras representativas de compuestos volátiles vegetales por grupos químicos de las diferentes rutas biosintéticas (Dudareva *et al.*, 2006).

Grupo	Compuesto ³	
Volátiles derivados de carotenoides		
	β-Ionona	Dihidroactinidiolida
Volátiles derivados de aminoácidos		
	3-Metilbutanol	2-Metilpropilacetato
Volátiles derivados de ácidos grasos		
	(Z)-3-Hexenal	(Z)-3-Hexen-1-ol

³ Fuente de las estructuras químicas: Base de datos NIST: <http://webbook.nist.gov/chemistry/>

Tabla 1.2. Continuación.

Grupo	Compuesto ⁴
Terpenoides	<div>  <p>Mirreno Linalool</p> <p>Monoterpenos Acíclicos</p> </div>
	<div>  <p>Mentona Limoneno</p> <p>Monoterpenos Monocíclicos</p> </div>
	<div>  <p>Pineno Careno</p> <p>Monoterpenos Bicíclicos</p> </div>
	<div>  <p>β-Farneseno Nerolidol</p> <p>Sesquiterpenos Acíclicos</p> </div>
	<div>  <p>Bisaboleno Zingibereno</p> <p>Sesquiterpenos Monocíclicos</p> </div>
	<div>  <p>Cariofileno δ-Deltacadineno</p> <p>Sesquiterpenos Bicíclicos</p> </div>
Volátiles fenilpropanoides / bencenoides	<div>  <p>Cedreno α-Santaleno</p> <p>Sesquiterpenos Tricíclicos</p> </div>
	<div>  <p>4,8-Dimetil-1,3E,8-dimetilnonatrieno 4,8,12-Trimetil-1,3E,7E,11-tridecatetraeno</p> <p>Homoterpenos</p> </div>
Volátiles fenilpropanoides / bencenoides	<div>  <p>Metilcinamato Chavicol</p> </div>
	<div>  <p>Metilchavicol Eugenol Metileugenol</p> </div>
	<div>  <p>Isoeugenol Metilisoegenol Fenilacetaldehído Feniletanol Alcohol bencilico</p> </div>
Volátiles fenilpropanoides / bencenoides	<div>  <p>Bencilacetato Benzaldehído Metilbenzoato</p> </div>
	<div>  <p>Salicilato de Metilo Feniletilbenzoato</p> </div>

1.3- Emisión de volátiles desde los vegetales a la atmósfera

Los CVV escapan a la atmósfera o rizosfera después de ser sintetizados. Las propiedades físico-químicas que permiten a los compuestos volátiles ser emitidos al mediambiente

⁴ Fuente de las estructuras químicas: Base de datos NIST: <http://webbook.nist.gov/chemistry/>

circundante, independientemente del órgano o tejido donde ocurra este proceso son lipofilidad, bajo peso molecular y alta presión de vapor (Widhalm *et al.*, 2015). La biosíntesis de compuestos volátiles en tejidos como flores o raíces, ocurre predominantemente en las células epidérmicas, que están más cerca de la atmósfera o rizosfera para su liberación inmediata (Dudareva *et al.*, 2004; Marín-Loaiza & Céspedes, 2007; Muhlemann *et al.*, 2014; Widhalm *et al.*, 2015). En los órganos vegetativos, los compuestos orgánicos volátiles son a menudo sintetizados en las células secretoras de tricomas glandulares localizados en la superficie de la hoja y luego secretados a un saco creado por una extensión de la cutícula, donde se almacenan hasta la ruptura mecánica (Dudareva *et al.*, 2004; Marín-Loaiza & Céspedes, 2007; Muhlemann *et al.*, 2014; Widhalm *et al.*, 2015). Cuando los tricomas no están involucrados en la producción vegetativa de CVV, estos compuestos son a menudo liberados a través de estomas, interrupción mecánica o emisión a través de cutícula (Widhalm *et al.*, 2015). Independientemente del tejido o de si salen a través de los estomas, a nivel subcelular, los compuestos volátiles deben moverse desde su sitio de biosíntesis a través del citosol hasta la membrana plasmática, para finalmente salir a la atmósfera, atravesando la membrana plasmática, la pared celular hidrofílica y, en algunos casos, la cutícula. Si bien la ruptura mecánica proporciona CVV directamente a la atmósfera desde el tejido celular, no queda claro cómo ellos atraviesan las barreras para liberarse al medio ambiente desde las células intactas o desde los espacios intercelulares conectados a los estomas (Widhalm *et al.*, 2015).

Se supone que tras la biosíntesis, los CVV difunden pasivamente a través de las barreras celulares hacia el medio ambiente (Widhalm *et al.*, 2015). Sin embargo, existen muchos ejemplos donde las altas tasas de emisión no pueden ser explicadas por un simple mecanismo de difusión dependiente del gradiente de concentración entre el interior y el exterior (Widhalm *et al.*, 2015). Sobre esta base se han propuesto mecanismos biológicos activos adicionales, que serían necesarios para explicar estas altas tasas de emisión (Widhalm *et al.*, 2015). Estos mecanismos se vuelven aún más importantes frente a un ataque herbívoro, donde la emisión de volátiles se incrementa drásticamente y la integridad de la membrana se ve comprometida sistemáticamente a lo largo de la planta (Dudareva *et al.*, 2006; Baldwin, 2010; Lucas-Barbosa *et al.*, 2011; Dudareva *et al.*, 2013; Niinemets *et al.*, 2013; Widhalm *et al.*, 2015). Por lo tanto, se han propuesto varios modelos para explicar la emisión de volátiles a la atmósfera desde las plantas basados en dos tipos de mecanismos diferentes: (a) difusión; y (b) mecanismos biológicos (Widhalm *et al.*, 2015).

1.3.1- Modelos de emisión basados en la difusión

En las últimas dos décadas, la emisión de compuestos volátiles se ha modelado como un proceso de difusión basado en la primera ley de Fick, que establece que el flujo en estado estacionario de cualquier molécula depende de un gradiente de concentración y de la resistencia a la difusión (Widhalm *et al.*, 2015). Este concepto dio lugar a varios modelos (Niinemets & Reichstein, 2003), según los cuales las emisiones son consecuencia de la difusión de los CVV a través de un gradiente de concentración, desde los compartimentos celulares, donde las concentraciones son relativamente más elevadas, hacia la atmósfera circundante, donde las concentraciones son más bajas, siendo, además, capaz de superar las barreras de difusión, donde las cutículas de las paredes celulares son las que ofrecen mayor resistencia a la difusión (Guenther *et al.*, 1994; Kuhn *et al.*, 2004; Marín-Loaiza & Céspedes, 2007; Widhalm *et al.*, 2015). La figura 1.11 ilustra el mecanismo de emisión por difusión.

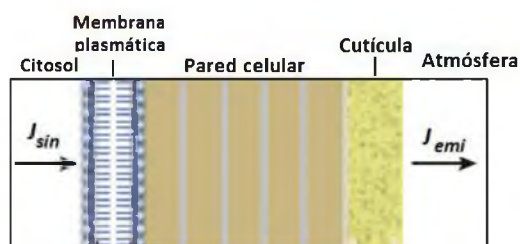


Figura 1.11. Modelo de emisión por difusión. J_{sin} y J_{emi} son los flujos de síntesis y emisión respectivamente (Widhalm *et al.*, 2015).

1.3.2- Modelos de emisión que involucran mecanismos biológicos

Los modelos basados únicamente en la difusión permiten explicar la emisión de compuestos volátiles pequeños, como el isopreno, en cuyo caso la difusividad puede ser lo suficientemente alta para superar las barreras de difusión sin que implique acumulación de altas concentraciones en las membranas (Widhalm *et al.*, 2015). Sin embargo, para que la mayoría de los CVV difundan pasivamente a una velocidad fisiológicamente relevante a través de las diferentes capas hidrofílicas, tales como la pared celular, se deberían acumular a niveles muy altos en las membranas para lograr un gradiente que supere la resistencia a la tasa de emisión que ofrecen dichas capas hidrofílicas (Widhalm *et al.*, 2015). Por ello, se han propuesto modelos que combinan la difusión con mecanismos biológicos para explicar la

emisión de volátiles de mayor peso molecular, sin que se requiera una acumulación de volátiles a niveles citotóxicos (Widham *et al.*, 2015).

Basándose en una analogía con el tráfico intracelular de otros compuestos hidrofóbicos, como las ceras y los diterpenos, varios mecanismos biológicos podrían estar involucrados en el desplazamiento de compuestos volátiles desde las células no dañadas hacia la atmósfera circundante (Jetter, 2006; Widhalm *et al.*, 2015). Según el modelo propuesto por Widhalm *et al.* (2015), los compuestos volátiles sintetizados en el citosol se particionan tanto en las membranas subcelulares como en las plasmáticas. Los CVV ubicados en las membranas internas podrían ser transportados dentro del espacio intracelular hacia la membrana plasmática por mecanismos de transporte vía retículo endoplásmico (RE) y aparato de Golgi. Estos procesos explicarían mejor la emisión de volátiles porque no requieren de su acumulación a niveles citotóxicos. Aunque el transporte vesicular de metabolitos es relativamente inexplorado en las plantas, se cree que cumpliría un rol en el movimiento de fitoquímicos citotóxicos, hormonas, compuestos antimicrobianos, pigmentos y componentes cuticulares cerosos (Weston *et al.*, 2012; McFarlane *et al.*, 2014; Widhalm *et al.*, 2015). Este mecanismo también podría explicar el transporte de volátiles sintetizados dentro de organelas, como los monoterpenos que se producen en plastidios, mecanismo análogo al recientemente propuesto para la transferencia de metabolitos lipofílicos entre plastidios y RE (Mehrshahi *et al.*, 2014). Alternativamente, el tráfico de volátiles en la membrana plasmática podría estar mediado por proteínas transportadoras solubles con sacos hidrofóbicos capaces de transportar compuestos lipofílicos a través de entornos acuosos (Widhalm *et al.*, 2015).

La translocación posterior de CVV desde de la membrana plasmática hacia el apoplasto implicaría el movimiento de moléculas hidrofóbicas a través de una capa lipofílica en un compartimento acuoso. Una posibilidad es que los transportadores localizados en la membrana plasmática estén implicados en el transporte de CVV hacia el exterior de la célula (Widhalm *et al.*, 2015). Esto sería similar al mecanismo recientemente propuesto para el transporte de ceras que forman la cutícula, las cuales son transportadas por vesículas hacia transportadores activos de la membrana plasmática que usan ATP para exportarlos al exterior celular (McFarlane *et al.*, 2014). En otro estudio se demostró que un transportador de la membrana plasmática de *Arabidopsis thaliana*, transporta el alcohol monolignol *p*-cumárico (Alejandro *et al.*, 2012), que es estructuralmente similar y comparte la misma vía biosintética central que isoeugenol, eugenol y vanillina, CVV emitidos por flores de *Petunia hybrida* (Muhlemann *et al.*, 2014).

La figura 1.12 muestra el modelo de emisión basado en una combinación de varios mecanismos biológicos y difusión propuesto por Widhalm *et al* (2015). En él se puede observar el movimiento de compuestos volátiles a través de cada barrera celular, y los mecanismos biológicos de tráfico desconocidos pero similares a otros compuestos hidrofóbicos (Niinemets & Reichstein, 2003; Jetter, 2006; Alejandro *et al.*, 2012; Weston *et al.*, 2012; Muhlemann *et al.*, 2014). Las posibles vías de seguimiento de vesículas para el transporte a través del citosol se representan mediante flechas de bloque. Las proteínas de transferencia de lípidos u otros tipos de proteínas portadoras pueden contribuir a transferir volátiles a través del estroma plastidial, del citosol y/o de la pared celular. Los transportadores localizados en la membrana plasmática pueden tener un papel importante en la exportación de volátiles desde el citosol o membrana hacia la pared celular. Los compuestos volátiles se difunden a través de la cutícula para su emisión al medio ambiente. No se excluye la participación de otros mecanismos biológicos (Widhalm *et al.*, 2015).

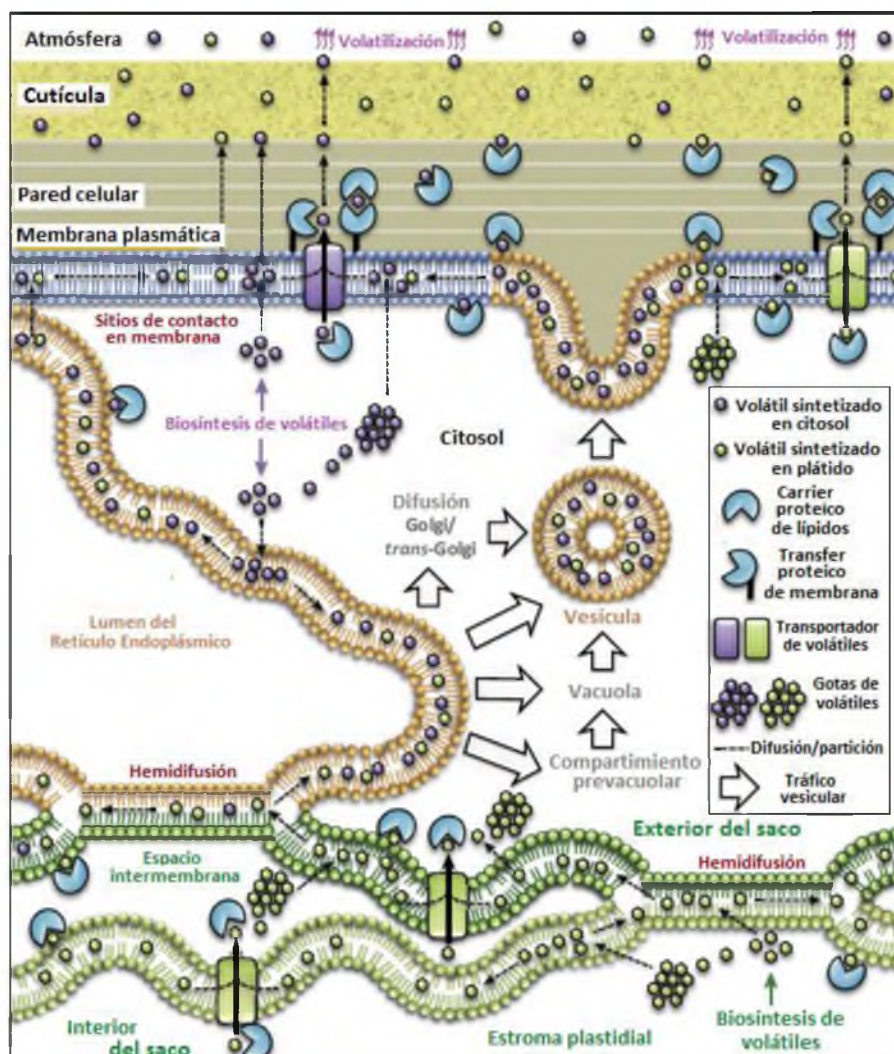


Figura 1.12. Modelos propuestos por Widhalm *et al* para el tráfico y emisión de compuestos orgánicos volátiles en células vegetales (Widhalm *et al.*, 2015).

1.4- Regulación de la emisión de compuestos volátiles vegetales

Debido a la variabilidad en cantidad, momentos del día y tejidos de emisión de volátiles, es de suponer que las plantas poseen mecanismos de control que regulan cuándo, dónde y cuáles sustancias producir, y en qué cantidades (Marín-Loaiza & Céspedes, 2007; Dudareva *et al.*, 2013; Muhlemann *et al.*, 2014). La emisión de CVV depende de muchos factores que pueden alterar ya sea la biosíntesis, la presión de vapor o su emisión hacia la atmósfera (Marín-Loaiza & Céspedes, 2007). Estos factores se clasifican en dos grupos principales: a) *genéticos* y *bioquímicos*, y b) *externos*, que pueden ser bióticos y abióticos (Marín-Loaiza & Céspedes, 2007; Muhlemann *et al.*, 2014; Widhalm *et al.*, 2015).

Los del primer grupo determinan la producción y emisión de volátiles a partir de la regulación de los niveles de las enzimas responsables de la biosíntesis y de la disponibilidad del sustrato en la célula, haciendo que las emisiones sean altamente específicas y regidas por el desarrollo de la planta (Marín-Loaiza & Céspedes, 2007). Por ejemplo, la emisión de CVV en las flores aumenta cuando están a punto para ser polinizadas (Dudareva *et al.*, 2004; Dudareva *et al.*, 2013).

Los factores bióticos externos de regulación de la emisión de CVV son ocasionados por la interacción con animales, plantas y microorganismos, ya que los compuestos producidos son empleados para la defensa, disuasión o atracción de polinizadores (Marín-Loaiza & Céspedes, 2007), como se vio en el apartado 1.1.

Los factores abióticos afectan fuertemente la cantidad y calidad de emisión de volátiles (Dudareva *et al.*, 2004), entre los que se pueden mencionar temperatura, luz, CO₂, humedad, O₃, disponibilidad de agua, además de otros factores como viento, granizo y la operación de cosecha (Marín-Loaiza & Céspedes, 2007). La temperatura regula las actividades de isopreno y monoterpene sintetasa (Niinemets *et al.*, 2004), controlando así la síntesis de la mayoría de los isoprenoides. La temperatura también afecta la respiración y puede regular indirectamente la cantidad de piruvato disponible para formar intermediarios isoprenoides en el cloroplasto (Niinemets *et al.*, 2004). Por otro lado, la temperatura también afecta la volatilidad de los CVV y, por lo tanto, los mecanismos de emisión que dependen de la difusión (Niinemets *et al.*, 2004). La disponibilidad de luz determina la cantidad de gliceraldehído-3-fosfato isoprenoide producido a través de la fotosíntesis, y también controla la disponibilidad de ATP y NADPH, necesarios para la síntesis de los compuestos volátiles altamente reducidos (Niinemets *et al.*, 2004). Quizás el ejemplo más documentado de los factores que afectan la

emisión de isoprenoides es el efecto del aumento de las concentraciones atmosféricas de CO₂. Un aumento en la concentración de CO₂ desacopla la emisión de isoprenoides y fotosíntesis porque reduce la disponibilidad de precursores isoprenoides o la actividad de monoterpene sintetasas (Niinemets *et al.*, 2004). La modificación de la emisión de isopreno en respuesta al cambio de la concentración atmosférica de CO₂ es rápida en las plantas cultivadas bajo condiciones ambientales controladas con elevadas concentraciones de CO₂ (Niinemets *et al.*, 2004). La figura 1.13 resume los factores que afectan la emisión de volátiles de las plantas.

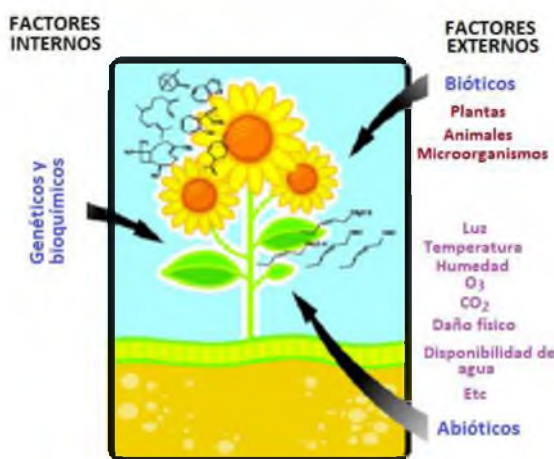


Figura 1.13. Factores que afectan la emisión de volátiles de las plantas (Marín-Loaiza & Céspedes, 2007).

Por lo visto en este capítulo, la investigación sobre CVV ha sido muy extensa en los últimos años, lo que ha permitido elucidar su papel clave en las intrincadas interacciones bióticas y abióticas. Algunos autores incluso llegan a sostener, de manera optimista, que podríamos estar cerca de entrar en una era de entendimiento de la “*psicología de las plantas*”, en la que el papel de los CVV sería similar a los impulsos nerviosos del sistema nervioso central humano (Hassan *et al.*, 2015). Sin embargo, la mayor parte de nuestro conocimiento sobre estas interacciones se limita a sólo unas pocas especies de plantas, y los mecanismos moleculares que gobiernan estos procesos todavía no son claros (Hassan *et al.*, 2015). Incluso algunos de los procesos biosintéticos de CVV, así como algunos relacionados con su emisión a la atmósfera y regulación, todavía se desconocen. Poco se sabe, por ejemplo, sobre la función de los compuestos individuales en las interacciones bióticas y abióticas, o sobre las cascadas de señalización implicadas en la percepción de CVV y/o la inducción de su biosíntesis (Dudareva *et al.*, 2013). Se requieren, entonces, investigaciones más profundas, interdisciplinarias, en entornos naturales o experimentales con mayor realismo ecológico, ya que el conocimiento de los factores que regulan la emisión orquestada de volátiles procedentes de diferentes vías metabólicas, la comprensión del tráfico de metabolitos

intracelulares y el mecanismo del proceso de liberación podría ser utilizado para el desarrollo de rasgos agronómicos mejorados en cultivos tales como resistencia a plagas y enfermedades, control de malezas, perfume mejorado de plantas ornamentales, polinización de cultivos de semillas, aroma mejorado de frutas y verduras, y producción de productos farmacéuticos en plantas medicinales, entre otros (Dudareva *et al.*, 2013).

Capítulo 2

Técnicas de análisis de compuestos volátiles vegetales

-
- 2.1- Técnicas de análisis de reservorios de compuestos volátiles vegetales.
 - 2.1.1- Técnicas tradicionales.
 - 2.1.1.1- Hidrodestilación.
 - 2.1.1.2- Destilación por arrastre con vapor de agua.
 - 2.1.1.3- Extracción con solventes orgánicos.
 - 2.1.1.4- Extracción combinada con destilación.
 - 2.1.2- Técnicas de desarrollo más reciente.
 - 2.1.2.1- Uso de las microondas.
 - 2.1.2.2- Extracción con fluidos en estado supercrítico.
 - 2.1.2.3- Extracción con agua subcrítica.
 - 2.1.2.4- Extracción con solventes a alta presión.
 - 2.1.2.5- Extracción asistida por ultrasonidos.
 - 2.1.2.6- Extracción por sorción en barra de agitación extractiva
 - 2.2- Técnicas de captura de compuestos volátiles vegetales.
 - 2.2.1- Análisis del espacio de cabeza dinámico.
 - 2.2.1.1- Purga y trampa.
 - 2.2.1.2- Arrastre en circuito cerrado.
 - 2.2.1.3- Sistemas de extracción y de extracción y empuje.
 - 2.2.2- Análisis del espacio de cabeza estático.
 - 2.2.2.1- Microextracción en fase líquida del espacio de cabeza
 - 2.2.2.2- Microextracción en fase sólida del espacio de cabeza
 - 2.3- Separación, identificación y cuantificación de compuestos volátiles por cromatografía de gases.
 - 2.4- Similitudes y discrepancias entre compuestos volátiles almacenados y emitidos.
 - 2.4.1- Factores que dependen de la técnica.
 - 2.4.2- Factores que dependen de las propiedades físico-químicas de las plantas.
 - 2.4.3- Factores biológicos.
 - 2.4.4- Factores de estrés bióticos y abióticos.
-

El creciente interés científico en la bioquímica, la fisiología, la ecología y la química atmosférica de los CVV ha llevado al desarrollo de una variedad de sistemas para su recolección y análisis (Tholl *et al.*, 2006; Ormeño *et al.*, 2011). En los últimos años, el análisis de CVV ha experimentado una notable mejora debido al diseño de instrumentos que pueden combinarse con cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS), los cuales permiten monitorear cambios rápidos en los perfiles de volátiles durante el desarrollo de las plantas o bajo condiciones de estrés (Tholl *et al.*, 2006; Ormeño *et al.*, 2011). Los sistemas de análisis de CVV que permiten mediciones en tiempo real y son, además, sensibles, rápidos y completamente automatizados, también son de importancia creciente para elucidar la biosíntesis de los CVV. Por otro lado, los enfoques de genómica funcional para dilucidar las vías metabólicas de los CVV que son productos de la acción de enzimas

recombinantes o provenientes de plantas mutantes y transgénicas, requieren de técnicas eficientes para el análisis de productos volátiles (Tholl *et al.*, 2006; Ormeño *et al.*, 2011).

Existen varios tipos de clasificaciones para las técnicas de análisis de CVV, siendo interesantes la que se desprenden del trabajo de Ormeño *et al* (2011), según el cual se las puede clasificar en dos grandes grupos: a) *técnicas de análisis de reservorios de CVV*, y b) *técnicas de captura de CVV*.

En las *técnicas de análisis de reservorios la matriz vegetal es el sustrato analítico*, mientras que en las *técnicas de captura los CVV se recolectan desde el espacio de cabeza de la planta*. Ambos tipos de técnicas pueden usarse directa o indirectamente para estudiar CVV almacenados en reservorios, sin embargo, sólo las de captura son útiles para estudiar CVV emitidos en tiempo real, los cuales no siempre están específicamente almacenados en reservorios de la planta (Loreto *et al.*, 2000).

2.1- Técnicas de análisis de reservorios de compuestos volátiles vegetales

2.1.1- Técnicas tradicionales

Los CVV pueden extraerse de las hojas cosechadas, proporcionando información cuantitativa y cualitativa sobre el espectro de compuestos producidos y su cantidad. Las técnicas de destilación y de extracción con solventes orgánicos son las tradicionales más utilizadas para obtener CVV almacenadas en el follaje cosechado (Ormeño *et al.*, 2011), por lo que serán las únicas desarrolladas a continuación.

2.1.1.1- Hidrodestilación

La técnica de extracción más ampliamente utilizada para liberar los CVV del material vegetal es la hidrodestilación (HD). Mediante esta metodología, los CVV son pasados a su forma gaseosa por acción del agua caliente, para luego condensarlos y obtener el aceite esencial (AE). Como el rendimiento de la HD es típicamente bajo, una cantidad sustancial de follaje de hojas frescas o previamente desecadas, se coloca dentro del destilador en contacto con agua. El volumen de agua que se coloca en la cámara extractora es seleccionado de acuerdo con la

cantidad de follaje y al rendimiento de AE deseado. Luego se calienta a ebullición. La temperatura del vapor de agua es suficientemente alta para descomponer las estructuras foliares que mantienen los CVV en el interior, pero es mucho menor que el punto de ebullición de la mayoría de los CVV, lo que evita la descomposición de la mayoría de los compuestos del aceite esencial. Durante el calentamiento, el material vegetal debe ser mantenido en constante agitación a fin de evitar aglomeraciones o sedimentación del mismo en el fondo del recipiente, lo que puede provocar su degradación térmica (Bandoni, 2000).

Debido a que el calentamiento se realiza en presencia de agua, la presión del vapor de agua aumenta y también lo hace la presión de vapor de los CVV, de modo que son arrastrados con el vapor de agua a través de un tubo hacia la cámara de condensación, donde tanto el agua como los volátiles se condensan. Los componentes hidrofóbicos del AE forman una película inmisible sobre la superficie del agua, la cual es separada por decantación, obteniéndose así el AE final. El tiempo total de destilación es función de los componentes presentes en el AE. Si el aceite contiene compuestos de alto punto de ebullición, el tiempo de destilación será mayor (Bandoni, 2000).

Los AE obtenidos mediante HD normalmente presentan notas más fuertes y un color más oscuro con respecto a los producidos por otros métodos. Además, la HD requiere mucho material vegetal y tiempo, por lo que su eficiencia es baja en términos de volumen de aceite esencial por 1 g de planta, requiriéndose una masa de follaje de al menos 100 g (Ormeño *et al.*, 2011). Por otra parte, es importante mencionar que la HD puede provocar cambios químicos en los CVV almacenados en las plantas. Los ésteres son sensibles a la hidrólisis, mientras que otros componentes tales como los hidrocarburos monoterpénicos acíclicos o los aldehídos, son susceptibles de polimerización (Bandoni, 2000). Los compuestos oxigenados, tales como los fenoles, tienden a ser parcialmente solubles en el agua de destilación, hecho por el cual es imposible la remoción completa de estos compuestos. Más aún, mediante la utilización de la HD suelen perderse algunos CVV, en especial aquellos compuestos monoterpénicos muy volátiles (Bandoni, 2000; Ormeño *et al.*, 2011).

La figura 2.1 muestra una representación esquemática de un equipo de HD.

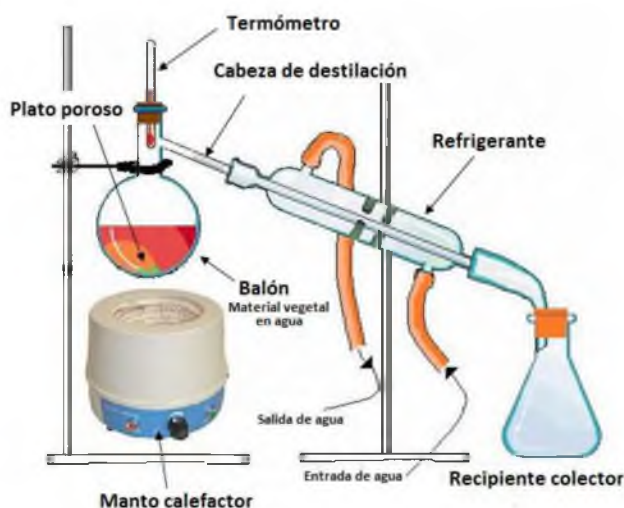


Figura 2.1. Representación esquemática de un equipo para hidrodestilación. ¹

2.1.1.2- Destilación por arrastre con vapor de agua

En esta técnica, una muestra de vegetal, generalmente fresca y cortada en trozos pequeños, se coloca en un recipiente cerrado y es sometida a una corriente de vapor de agua, de modo que los CVV son arrastrados y posteriormente condensados en forma de AE, el cual se separa de la fracción acuosa del mismo modo que en la HD. En este caso, el vapor de agua ejerce la doble función de calentar la mezcla hasta su punto de ebullición y adicionar presión de vapor a la de los CVV del AE (Bandoni, 2000).

Las ventajas de esta técnica con respecto a la HD son la reducción del tiempo del proceso, limitación en la oxidación de los constituyentes naturales, reducción de las pérdidas de los compuestos más polares y ahorro de energía (Ormeño *et al.*, 2011). Sin embargo, se ha observado la hidrólisis de compuestos extraídos (Oszagyan *et al.*, 1996). La figura 2.2 muestra una representación esquemática de un equipo para destilación por arrastre con vapor de agua.

La desventaja general de los métodos de destilación es que es difícil determinar cuantitativamente el aceite esencial de pequeñas cantidades de follaje ya que los rendimientos son típicamente bajos, lo que requiere de una gran cantidad de material vegetal (Ormeño *et al.*, 2011).

¹ Fuente: <http://biologiafavaloro.blogspot.com.ar/2011/11/laboratorio-quimica-organica.html>



Figura 2.2. Representación esquemática de equipo para destilación por arrastre con vapor de agua.²

2.1.1.3- Extracción con solventes orgánicos

Los CVV pueden también extraerse con solventes orgánicos. La eficacia de extracción depende de la elección correcta de los solventes, del uso de agitación y de la elección de la temperatura para aumentar la solubilidad de CVV y mejorar la transferencia de masa desde el material vegetal hacia el solvente (Ormeño *et al.*, 2011). Se obtienen recuperaciones óptimas con procesos de extracción a temperaturas por debajo de 25-30 °C, agitación, pequeñas cantidades de follaje molido (~ 1 g) y períodos de tiempo cortos (20-30 min) (Ormeño *et al.*, 2007; 2008). La extracción simple con solvente permite la recuperación de muchos de los compuestos monoterpénicos que se pierden por HD debido a las altas temperaturas (Ormeño *et al.*, 2011). Además, tiene un alto rendimiento de aceite esencial por cantidad de planta (una alícuota de 0,5 g puede ser suficiente para algunas especies) (Ormeño *et al.*, 2011). Obviamente, una desventaja de esta técnica es que puede extraer sustancias no volátiles (principalmente ceras de cutícula), cuya remoción puede provocar pérdidas posteriores de CVV (Ormeño *et al.*, 2011).

La extracción con solvente también puede conseguirse mediante la utilización de un aparato de Soxhlet. Utilizando este dispositivo, el follaje se eluye constantemente con disolvente fresco (Ormeño *et al.*, 2011). Un depósito de solvente se calienta suavemente, permitiendo que se vaporice y por medio de un condensador, el solvente vuelve a convertirse en líquido goteando sobre la muestra de planta, extrayendo de ese modo los CVV presentes. El follaje está contenido en una taza porosa que permite que el solvente fluya hacia su depósito en el cual se está calentando el solvente. Esta técnica tiene la ventaja de permitir el reciclaje de

² Fuente: <https://www.slideshare.net/Javierelera/procesos-de-la-post-cosecha-de-limn>

solventes (Ormeño *et al.*, 2011). Las desventajas de esta metodología son: a) mala recuperación de compuestos altamente volátiles o termolábiles; b) se requieren altos tiempos de extracción (3-24 h); c) descomposición térmica de los compuestos almacenados, ya que la extracción se produce habitualmente al punto de ebullición del solvente durante mucho tiempo; d) co-extracción de compuestos no volátiles y e) pérdidas de compuestos volátiles si se requieren etapas de concentración debido al uso de grandes volúmenes de solvente orgánico (Ormeño *et al.*, 2011).

Para ambas técnicas de extracción, el extracto de la planta resultante, denominado *concreto*, puede ser evaporado al vacío sin el uso de calor (Ormeño *et al.*, 2011). En general, el extracto resultante, denominado *absoluto*, es altamente concentrado de CVV y sin la presencia de ceras naturales (Rout *et al.*, 2007).

2.1.1.4- Extracción combinada con destilación

Una extracción combinada de manera simultánea con la destilación (SDE), puede lograrse con un instrumento de Likens-Nickerson (Figura 2.3) (Roberts & Brevard, 2001). Un matraz con baño de calentamiento contiene la muestra de planta en agua, mientras que otro matraz contiene el solvente, generalmente de bajo punto de ebullición como pentano, dentro de un baño de calentamiento (Ormeño *et al.*, 2011). Un refrigerador y un separador de condensador permiten un atrapado eficiente de la condensación de los volátiles. A pesar del largo tiempo de extracción requerido, especialmente cuando la matriz contiene una cantidad importante de lípidos, la SDE es un método muy comúnmente utilizado (Stashenko *et al.*, 2004; Kraujalytė *et al.*, 2013; Lin *et al.*, 2013; Teng & Lee, 2014).

Sin embargo, es importante mencionar que se debe tener en cuenta que algunos compuestos encontrados en los extractos de follaje obtenidos por SDE, son en realidad productos de pirólisis o hidrólisis durante el proceso (Ormeño *et al.*, 2011) más que CVV presentes de forma natural en la muestra vegetal tratada.

Existen versiones de SDE micro, las cuales permiten el uso de pequeñas cantidades de solventes de extracción sin requerir la concentración posterior del extracto, reduciendo así las pérdidas de CVV (Ormeño *et al.*, 2011).

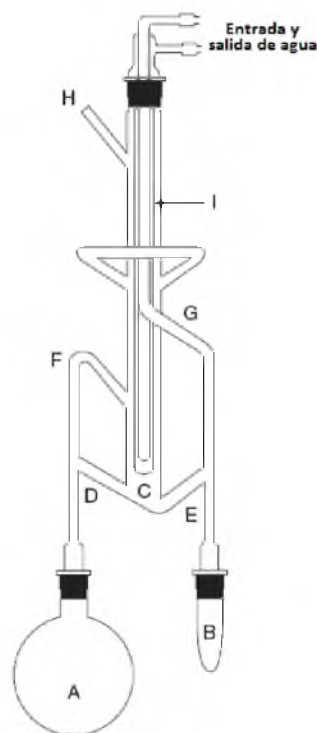


Figura 2.3. Sistema de extracción combinada con destilación. A: Recipiente que contiene la muestra de planta en agua; B: Recipiente para el solvente; C: Cámara de separación; D: Tubo de retorno para el agua; E: Tubo de retorno para el solvente; F: Tubo de vapor de agua; G: Tubo de vapor de solvente; H: Entrada/ventilación; I: dedo frío (Roberts & Brevard, 2001).

No existe un consenso claro sobre las eficiencias de extracción de CVV obtenidas con las diferentes técnicas anteriormente mencionadas. Por ejemplo, por un lado, la extracción con Soxhlet tiene mejores eficiencias de extracción de monoterpeno que la simple extracción con disolvente, pero proporciona recuperaciones más pobres que SD para hojas de *Juglans regia* (nogal), una especie que presenta tricomas glandulares (Ormeño *et al.*, 2011). Por otro lado, la extracción con Soxhlet parece ser una técnica más conveniente que SD para la extracción de monoterpenos de *Thymus sp.* (tomillo), que también presenta tricomas glandulares (Ormeño *et al.*, 2011). Tales diferencias están relacionadas con la configuración del método y con las diferencias morfológicas dentro del mismo tipo de estructura de almacenamiento del vegetal (Ormeño *et al.*, 2011).

2.1.2- Técnicas de desarrollo más reciente

Las técnicas tradicionales de extracción con solventes de materiales vegetales requieren un tiempo de extracción largo a temperaturas generalmente elevadas, corriendo así un grave riesgo de degradación térmica y pérdida para la mayoría de los fitoconstituyentes (Mandal *et*

al., 2007). En los últimos años, se han hecho progresos importantes en el desarrollo de nuevas técnicas de separación de CVV, las cuales requieren tiempos de extracción más cortos, consumen menos disolventes, se contaminan menos de productos de degradación, oxidación, hidrólisis, e isomerización y, por lo tanto, protegen más a los componentes termolábiles y químicamente activos (Mandal *et al.*, 2007; Ormeño *et al.*, 2011).

2.1.2.1- Uso de las microondas

Entre los métodos de desarrollo reciente, las microondas, en una variedad de combinaciones, se utilizan cada vez más como fuente de calor para ayudar a la extracción de aceites esenciales (Ormeño *et al.*, 2011).

Las microondas son ondas electromagnéticas no ionizantes de frecuencia entre 0,3 y 300 GHz, y se encuentran situadas entre los rayos X y los rayos infrarrojos del espectro electromagnético. Están formadas por dos campos perpendiculares oscilantes, uno eléctrico y otro magnético. El principio de calentamiento por microondas se basa en su impacto directo sobre materiales y solventes polares, y se rige por dos fenómenos: la conducción iónica y la rotación dipolar, que, en la mayoría de los casos, ocurre de manera simultánea (Mandal *et al.*, 2007). La conducción iónica se refiere a la migración electroforética de iones bajo la influencia del campo eléctrico que cambia rápidamente ($4,9 \times 10^4$ veces por segundo). La resistencia ofrecida por la solución a la migración de iones genera fricción, que eventualmente calienta la solución. La rotación dipolo implica el realineamiento de los dipolos de la molécula con el campo eléctrico cambiante (Mandal *et al.*, 2007). Por esa razón, sólo los materiales o solventes con dipolos permanentes se calientan bajo el efecto de las microondas (Figura 2.4).

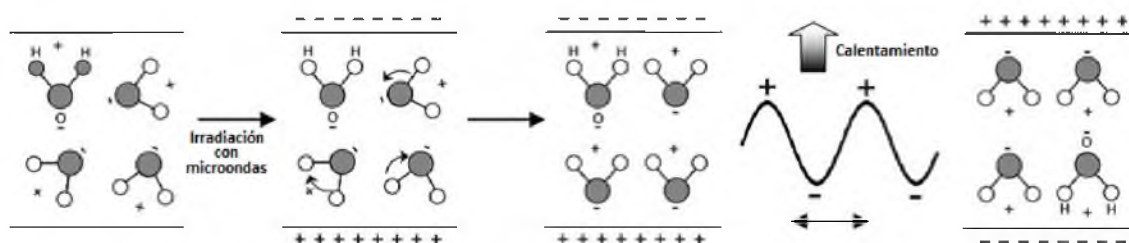


Figura 2.4. Mecanismo de calentamiento de agua en un campo de microondas (Tsuiji *et al.*, 2005).

A diferencia de la calefacción convencional que depende de la conducción, fenómeno de convección donde gran parte de la energía térmica se pierde hacia el medio ambiente, el

calentamiento con microondas se produce de una manera selectiva, donde el calor prácticamente no se pierde al ambiente, si ocurre en un sistema cerrado (Mandal *et al.*, 2007).

Las microondas se aplican, por ejemplo, para ayudar durante la extracción con solvente (extracción con solvente asistida por microondas, MASE). En este caso, las microondas calientan directamente un solvente que extrae los CVV (Mandal *et al.*, 2007). La extracción con solventes de componentes vegetales usando microondas se basa en que, aún en las plantas desecadas, las células contienen pequeñas huellas microscópicas de humedad, que cuando se calienta dentro de la célula de la planta debido al efecto de las microondas, se evapora y genera presión sobre la pared celular, empujándola desde el interior, estirándola y finalmente rompiéndola, lo que facilita la lixiviación de los constituyentes activos desde las células rotas hacia el solvente circundante, enriqueciéndolo así con los fitoconstituyentes (Mandal *et al.*, 2007). Además de tener la ventaja de alta velocidad de extracción, la MASE también permite una reducción significativa en el consumo de solvente orgánico (por lo general menos de 40 mL, en comparación con los 100-500 mL necesarios en la extracción con Soxhlet) (Huie, 2002).

Las microondas también se han utilizado para ayudar durante HD (HD asistida por microondas, MAHD) dando lugar a rendimientos de extracción de ligera a fuertemente mayores (Ormeño *et al.*, 2011).

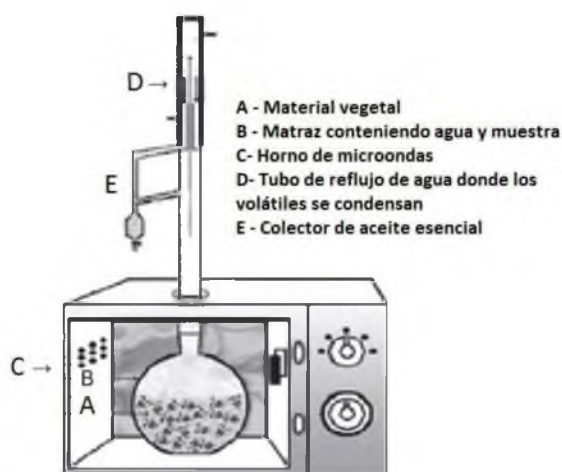


Figura 2.5. Esquema de un equipo de hidrodestilación asistida por microondas (Ormeño *et al.*, 2011).

Cabe mencionar también que se han desarrollado técnicas con aplicación de microondas sin el uso de solventes de extracción (SFME) (Ormeño *et al.*, 2011). En ellas, las hojas frescas, sin adición de agua o cualquier otro disolvente, se colocan en el reactor de un aparato de

microondas. En SFME mejorada, también se puede usar material vegetal previamente desecado.

Las ventajas del uso de las microondas son: (a) tiempos de extracción más cortos; (b) resulta una técnica más adecuada para extraer sustancias termolábiles, ya que trabaja a temperaturas más bajas; y (c) con esta técnica se logran extracciones reproducibles.

Una desventaja de estas técnicas es que hay pruebas de que se produce isomerización cuando se utiliza una elevada potencia de microondas (Ormeño *et al.*, 2011).

2.1.2.2- Extracción con fluidos en estado supercrítico

La extracción con fluido supercrítico (SFE) es un método de extracción libre de solventes, usualmente llevado a cabo usando CO₂, solvente supercrítico de elección en la extracción de aromas y compuestos de fragancia, ya que es un gas inodoro, incoloro, altamente puro, seguro, rentable, no inflamable y reciclable, que permite una operación supercrítica a presiones relativamente bajas y cerca de la temperatura ambiente (Ormeño *et al.*, 2011; Pourmortazavi & Hajimirsadeghi, 2007; Capuzzo *et al.*, 2013). A alta presión, el CO₂ se convierte en un líquido y actúa como un solvente que se puede utilizar para extraer el AE del material vegetal (Capuzzo *et al.*, 2013). En esas condiciones, presenta propiedades líquidas (solvente con tensión superficial despreciable) y propiedades similares al gas (transporte) (Capuzzo *et al.*, 2013). Además, su densidad es igual a la del líquido, mientras que su viscosidad igual a la del gas (Esquivel & Aguilar, 2007).

En términos generales, el CO₂ en estado supercrítico se comporta como un solvente lipófilo, pero, en comparación con los solventes líquidos, tiene la ventaja de que su selectividad o potencia disolvente se puede ajustar con la presión (Capuzzo *et al.*, 2013). Mientras que la solubilidad de un compuesto en un solvente líquido clásico depende de la temperatura, la solubilidad de un compuesto disuelto en un fluido supercrítico depende tanto de la temperatura como de la presión. La presión es, entonces, un factor de selectividad de la extracción, al igual que la temperatura, y en conjunto provocan variación de densidad, difusividad y viscosidad, permitiendo la separación fraccionada de solutos y solventes (Bandoni, 2000; Pourmortazavi & Hajimirsadeghi, 2007). Cuando la presión es alta, la solubilidad de un compuesto aumenta con la temperatura. Por otra parte, para presiones bajas, la solubilidad de los compuestos decrece al aumentar la temperatura. La figura 2.6 muestra un diagrama de fases que muestra las condiciones del estado supercrítico.



Figura 2.6. Diagrama de fases de una sustancia pura en sistema cerrado. En la parte superior derecha se ve el fluido supercrítico. Como se puede apreciar, acostumbra a obtenerse a altas presiones y temperaturas. En el caso del CO₂, el punto crítico es a 7,4 MPa y 32 °C (Capuzzo *et al.*, 2013).³

En la extracción con fluido supercrítico el CO₂ es forzado a entrar en un tanque de acero inoxidable que contiene el material vegetal, de modo que el fluido entra en contacto con la matriz y arrastra a los solutos. Finalmente, la presión se libera, de modo que, a medida que disminuye la presión, el CO₂ retorna a un estado gaseoso y sólo queda el extracto de la planta (Pourmortazavi & Hajimirsadeghi, 2007; Danlami *et al.*, 2014) (Figura 2.7). Los parámetros que afectan a la extracción son presión, temperatura y flujo (Pourmortazavi & Hajimirsadeghi, 2007).

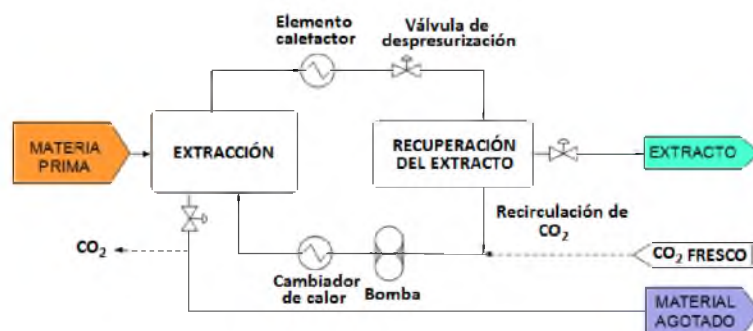


Figura 2.7. Esquema de un proceso de extracción con CO₂ supercrítico.⁴

Las principales ventajas de la SFE son: (a) las temperaturas bajas de trabajo evita modificaciones químicas por acción del calor; (b) no deja residuos de solvente; (c) tiene una alta eficiencia en términos de volumen de aceite esencial por masa vegetal; (d) bajo costo y abundancia del CO₂ en comparación con los solventes orgánicos; (e) se puede modificar la

³ Fuente: <https://lidiakonlaquimica.wordpress.com/2015/08/19/extraccion-con-fluidos-supercriticos/>

⁴ Fuente: http://pendientedemigracion.ucm.es/info/otri/complutecno/fichas/tec_lcalvo2.htm

selectividad a través de cambios de presión, temperatura y flujo; y (f) posee una difusión similar a un gas, lo que le permite permear a través de materiales sólidos muy fácilmente (Ormeño *et al.*, 2011).

Entre las desventajas están: (a) extrae sustancias relativamente polares, lo que hace necesario el uso de solventes orgánicos, denominados modificadores; y (b) la co-extracción de ceras es inevitable, aunque este punto puede considerarse en algunos casos ventajoso ya que algunas ceras (ésteres de cera) estabilizan el aceite esencial y retrasan la evaporación de las fragancias (Ormeño *et al.*, 2011).

En comparación con HD, los rendimientos de extracción con SFE pueden ser hasta 6 veces mayores. El rendimiento de extracción de sesquiterpenos con SFE y el número de compuestos extraídos son también más altos que con SDE, HD y MAHD. Sin embargo, SFE no parece una metodología adecuada para extraer monoterpenos, a diferencia de la SDE, que se ha destacado por ser más eficiente que la SFE, HD y MAHD en este tipo de compuestos. Uno de los principales inconvenientes de la SFE es su limitación a las sustancias no polares y medianamente polares (Ormeño *et al.*, 2011).

2.1.2.3- Extracción con agua subcrítica

Se ha propuesto como alternativa a la SFE, la extracción continua con agua subcrítica (SWE), que permite la extracción de terpenos más polares, como los terpenos oxigenados (Ormeño *et al.*, 2011). El agua subcrítica es agua con una presión entre 1 y 218 bar y temperaturas por debajo de 374 °C. A mayor presión y temperatura, el agua se comportará como un fluido supercrítico (Figura 2.8).

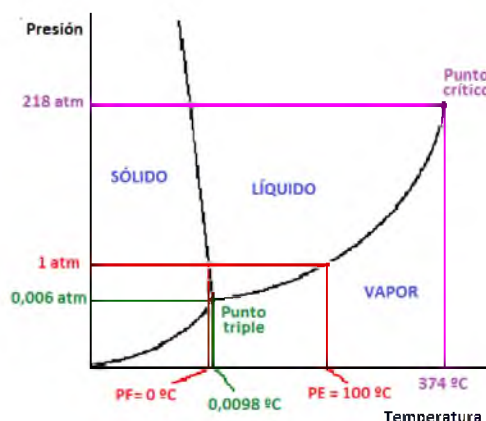


Figura 2.8. Diagrama de fases del agua.

El SWE continuo se basa en el uso de agua como disolvente para la extracción. El material vegetal colocado en una cámara de extracción libera los volátiles en respuesta al calentamiento en un horno y la presión se regula para mantener el agua en la fase líquida. Las temperaturas se encuentran comprendidas en el rango de 125-150 ° C, aunque cabe mencionar, que en procedimientos aplicados a muestras de *Origanum sp.* (orégano), temperaturas superiores a 125 °C producen degradación del extracto (Ormeño *et al.*, 2011). Posteriormente, se requiere una extracción líquido-líquido con un solvente orgánico para concentrar los volátiles contenidos en la solución acuosa. El método es rápido y en sólo 10-20 minutos se puede procesar una muestra, obteniéndose mayores rendimientos que mediante la utilización de la HD tradicional (Ormeño *et al.*, 2011). SWE es particularmente útil para la extracción de terpenos oxigenados, ya que su afinidad por el agua es mayor que la de las especies no oxigenadas. Sin embargo, se pueden producir pérdidas de monoterpenos oxigenados si se usan temperaturas por encima de 175°C (Ormeño *et al.*, 2011).

2.1.2.4- Extracción con solventes a alta presión

La extracción con disolvente a alta presión (PSE) se basa en el uso de solvente orgánico calentado y presurizado. El solvente se bombea a un recipiente de extracción donde la muestra está contenida en una bolsa porosa denominada dedal (Ormeño *et al.*, 2011). La alta presión evita que el solvente hierva, mientras que la alta temperatura acelera el proceso de extracción al aumentar la penetración del solvente en la matriz vegetal. Estas características junto con la solubilidad del analito en el solvente (aumento del coeficiente de reparto para solventes no polares), aumentan la tasa de desorción del analito de la matriz de la muestra (Ormeño *et al.*, 2011). Las variaciones de temperatura y presión durante el proceso PSE tienen influencia sobre el comportamiento de solubilidad de los compuestos (Dawidowicz *et al.*, 2008).

El aumento de la temperatura tiende a acelerar la tasa de extracción aumentando la solubilidad y la velocidad de transferencia de masa (Danlami *et al.*, 2014). Además, reduce la viscosidad y la tensión superficial de los solventes, ayudándolos a extenderse uniformemente sobre la muestra y mejorar la tasa de extracción (Danlami *et al.*, 2014).

Las ventajas de esta técnica son: (a) tiempos de extracción más cortos y menor consumo de solvente; y (b) los extractos finales son lo suficientemente limpios para el análisis directo por cromatografía gaseosa (GC) sin necesidad de ningún pretratamiento. Este último es el gran

beneficio del método porque para los analitos volátiles, cada manipulación adicional de muestras aumenta el peligro de pérdidas (Ormeño *et al.*, 2011).

Las principales desventajas son: (a) el uso de temperaturas muy altas da un rendimiento muy bajo de monoterpenos (recuperaciones de limoneno 5 veces menores que con Soxhlet); y (b) co-extracción de especies no volátiles (Ormeño *et al.*, 2011).

En comparación con los métodos tradicionales, PSE reduce el consumo de solventes y el tiempo de preparación de la muestra de horas a minutos (Ormeño *et al.*, 2011). Más aún, comparándolo con la extracción de HD, SFE y Soxhlet, PSE es el método más adecuado, por ejemplo, para obtener el aceite esencial de tomillo (Dawidowicz *et al.*, 2008). En comparación con los otros métodos, su eficacia es superada sólo por la de extracción Soxhlet, pero PSE puede ser realizada en menos tiempo (Ormeño *et al.*, 2011).

2.1.2.5- Extracción asistida por ultrasonidos

La extracción asistida por ultrasonidos (UAE) se ha combinado con diferentes técnicas (por ejemplo, SFE y extracción con solvente de agitación convencional) (Ormeño *et al.*, 2011). La aplicación del ultrasonido facilita la liberación del aceite esencial de las paredes celulares de la materia vegetal sometida al proceso extractivo (Bandoni, 2000).

El ultrasonido es una onda sonora cuya frecuencia supera el límite perceptible por el oído humano, encontrándose en la región de frecuencias entre 0,018 y 100 MHz. Las zonas de ultrasonido de alta intensidad y bajas frecuencias (entre 20 y 100 kHz) son las que se utilizan en los procesos de extracción (Roble-Ozuna & Ochoa-Martínez, 2012). El efecto del ultrasonido está asociado a fenómenos de cavitación gaseosa, producida en las zonas de un líquido que se encuentran sometidas a presiones de alta amplitud que alternan rápidamente. Durante la mitad negativa del ciclo de presión, el líquido se encuentra sometido a un esfuerzo tensional de expansión, mientras que, durante la mitad positiva del ciclo, experimenta una compresión. El resultado es la formación ininterrumpida de microburbujas cuyo tamaño aumenta miles de veces en la alternancia de los ciclos de presión. Las microburbujas que alcanzan un tamaño crítico implosionan o colapsan violentamente para volver al tamaño original (Figura 2.9). La implosión supone la liberación de toda la energía acumulada, ocasionando incrementos de temperatura instantáneos y focales, que se disipan sin que suponga una elevación sustancial de la temperatura del líquido tratado. Sin embargo, la energía liberada, así como el choque mecánico asociados al fenómeno de implosión, afectan

la estructura de las células situadas en el microentorno (Roble-Ozuna & Ochoa-Martínez, 2012).

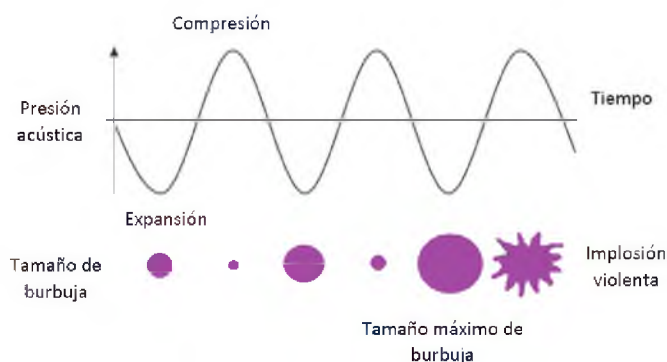


Figura 2.9. Fenómeno de cavitación durante el ultrasonido de alta intensidad.⁵

Los efectos mecánicos del ultrasonido en UAE permiten una mayor penetración del solvente en los materiales celulares y, por lo tanto, mejoran la transferencia de masa (Danlami *et al.*, 2014). Además, altera las paredes celulares de los vegetales, facilitando la liberación de los contenidos. Por lo tanto, la disrupción celular y la transferencia de masa eficaz son los principales factores que mejoran la extracción con ultrasonido (Danlami *et al.*, 2014).

UAE aumenta el rendimiento de los solventes y se realiza a temperaturas más bajas, por lo que es menos propenso a dar lugar a pérdidas de compuestos térmicamente inestables, sin embargo, pueden ocurrir isomerización y descomposición de compuestos químicamente inestables (Ormeño *et al.*, 2011). UAE proporciona rendimientos de extracción más pequeños que los métodos clásicos (HD, SD, Soxhlet) y algunos métodos de extracción recientes (por ejemplo, PSE) (Ormeño *et al.*, 2011). Por otra parte, se ha demostrado que puede conducir a la formación de radicales libres y, por lo tanto, a cambios estructurales en las moléculas constitutivas de los extractos (Ormeño *et al.*, 2011).

Según algunos estudios que han comparado las eficiencias de las diferentes técnicas de extracción, SDE es el más adecuado para la extracción de monoterpenos no oxigenados, mientras que MAHD es particularmente adecuado para monoterpenos oxigenados, y SFE para sesquiterpenos (Stashenko *et al.*, 2004). PSE también parece ser una técnica prometedora, ya que muestra una eficiencia de extracción de CVV de hojas de nogal para todos los grupos volátiles superior a la que se logra con SD, extracción con Soxhlet y extracción con disolvente (Ormeño *et al.*, 2011).

⁵ Fuente: <https://www.uaeh.edu.mx/scige/boletin/icap/n3/a5.html>

2.1.2.6- Extracción por sorción en barra de agitación extractiva

La extracción por sorción en barra de agitación extractiva (SBSE) fue introducida por Baltussen *et al* (1999) como un método de preparación de muestras sin disolventes para la extracción y enriquecimiento de compuestos orgánicos a partir de matrices acuosas (David & Sandra, 2007). Para ello se utilizó polidimetilsiloxano (PDMS) como medio de extracción tanto de muestras líquidas como gaseosas (Baltussen *et al.*, 1999). Las razones del uso de PDMS fueron (Baltussen *et al.*, 1999): (a) los analitos son retenidos por absorción, no adsorción, y, siendo esta sorción un proceso mucho más débil que la adsorción, la degradación de los analitos inestables es significativamente menor o ausente en el PDMS en comparación con otros adsorbentes; (b) debido a la menor interacción con los analitos, los compuestos pueden ser desorbidos a temperaturas más bajas, minimizando así las pérdidas de solutos termolábiles; (c) la capacidad de retención de PDMS para un determinado compuesto no es influenciada por la presencia de grandes cantidades de agua u otros analitos, ya que todos los solutos tienen su propio equilibrio de partición en la fase PDMS y no ocurre el desplazamiento; y (e) los productos de degradación del PDMS son fácilmente identificables, a diferencia de los adsorbentes orgánicos que dan lugar a productos de degradación orgánicos que pueden interferir en el análisis.

La extracción se lleva a cabo en un recipiente de aproximadamente 30 mL de volumen total donde se colocan aproximadamente 20 mL de volumen de la muestra acuosa. A continuación se introduce la barra de agitación que puede ser, por conveniencia, de 1 cm de longitud y cubierta con 24 μ L de volumen de fase PDMS, siendo de entre 0,5 y 1 mm de espesor más común (Prieto *et al.*, 2010). Las barras se usan para agitar muestras acuosas, extrayendo y enriqueciendo el recubrimiento de PDMS con los solutos volátiles. El proceso puede ocurrir ya sea por inmersión en el medio líquido de la muestra y extracción directa sobre la barra de agitación recubierta con PDMS o por exposición de la misma en el espacio de cabeza (Figura 2.10). Después de la extracción, puede usarse desorción térmica o desorción por extracción con solventes (David & Sandra, 2007).

La SBSE es una técnica de equilibrio de reparto líquido-líquido (David & Sandra, 2007) y, para extractos acuosos, la extracción de solutos desde la fase acuosa hacia la barra de agitación se controla mediante el coeficiente de reparto de los solutos entre la fase de PDMS y la fase acuosa (Baltussen *et al.*, 1999; David & Sandra, 2007).

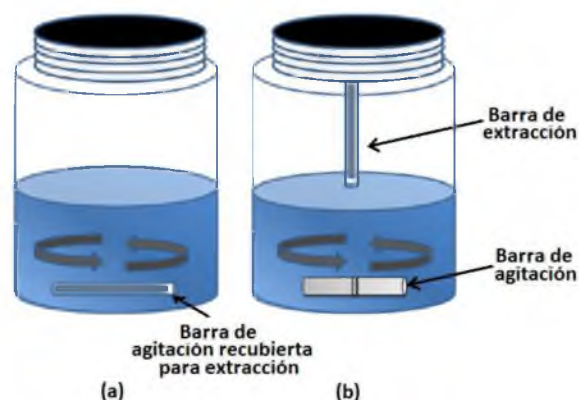


Figura 2.10. Modos de extracción con barras de agitación recubiertas con PDMS: (a) por inmersión y (b) en el espacio de cabeza (Prieto *et al.*, 2010).

SBSE consta de dos etapas principales: la extracción y la desorción (Baltussen *et al.*, 1999; David & Sandra, 2007; Prieto *et al.*, 2010). Durante la extracción, la barra de agitación revestida con PDMS se pone en contacto con los solutos. En el modo de inmersión, la barra de agitación revestida con polímero se añade a un vial que contiene la muestra líquida (típicamente un extracto acuoso de la planta), y se agita en condiciones físicas y químicas controladas (Prieto *et al.*, 2010). Después de la extracción, se retira la barra de agitación, se enjuaga con agua destilada para eliminar sales, azúcares, proteínas u otros componentes de la muestra y se sumerge en un papel limpio para eliminar el agua. El enjuague no causa pérdida de solutos, ya que, cuando se utiliza PDMS, los solutos se absorben en la fase polimérica. La mayoría de las aplicaciones en la literatura se realizan en el modo de inmersión (Prieto *et al.*, 2010; Kawaguchi *et al.*, 2013). Como se puede observar en la Figura 2.10b, en el modo de espacio de cabeza, el muestreo se realiza suspendiendo la barra de agitación recubierta con PDMS en el espacio de cabeza del vial, de modo que el polímero está en contacto estático con la fase de vapor de una matriz. La muestra se agita habitualmente para favorecer el paso de los solutos a la fase vapor. Después del muestreo del espacio de cabeza también se recomienda enjuagar la barra agitadora recubierta con agua destilada y secarla sobre un papel limpio. Cabe remarcar que trabajar en el modo de espacio de cabeza evita la absorción de especies no volátiles y aumenta la vida útil de la barra de agitación (Prieto *et al.*, 2010).

La etapa de extracción es seguida por una de desorción térmica o líquida antes de la separación y detección cromatográfica (Baltussen *et al.*, 1999; David & Sandra, 2007; Prieto *et al.*, 2010). La mayoría de las aplicaciones de SBSE implican el uso de desorción térmica seguida de GC para el análisis de los analitos acumulados en la barra de agitación recubierta, lo que implica no usar solventes orgánicos y permitir la completa introducción de los solutos extraídos en el sistema cromatográfico (Prieto *et al.*, 2010). La desorción térmica se realiza a

temperaturas en el rango de 150 a 300 °C, pudiendo tardar hasta 15 min. Sin embargo, la alta sensibilidad de la desorción térmica requiere el uso de una unidad de desorción térmica en la instalación del GC.

La desorción líquida es una alternativa a la térmica cuando se analizan solutos térmicamente lábiles, cuando la separación se lleva a cabo usando cromatografía líquida o electroforesis capilar o cuando no se dispone de una unidad de desorción térmica acoplada al GC. Durante la desorción líquida, la barra de agitación recubierta con PDMS se sumerge en un solvente o en una mezcla de solventes para la desorción química de los solutos presentes en la fase PDMS. El volumen mínimo del solvente de extracción debe garantizar la inmersión completa de la barra de agitación recubierta y, además, los solventes o mezclas utilizadas en esta etapa deben ser compatibles con el PDMS. Los solventes de desorción más comúnmente utilizados son acetonitrilo, metanol y sus mezclas en diversas proporciones con agua, además de soluciones buffer acuosas, aunque también se han estudiado isooctano y acetato de etilo (Prieto *et al.*, 2010). Algunos autores han atribuido las bajas recuperaciones obtenidas en el isooctano a la fuerte partición de los solventes no polares en la fase PDMS, dando como resultado un aumento sustancial del peso de la barra de agitación (Prieto *et al.*, 2010). Dado que los solventes polares son los más utilizados en la desorción líquida, este modo de desorción es principalmente útil para compuestos no volátiles y termolábiles con una polaridad intermedia (Prieto *et al.*, 2010). La desorción líquida se acelera mediante agitación mecánica, aumento de temperatura o sonicado (Prieto *et al.*, 2010) y se ha combinado con GC o con cromatografía líquida.

El uso de SBSE en la determinación de CVV requiere de la extracción previa de los analitos de la matriz vegetal para lograr un análisis eficiente (Yang *et al.*, 2013). En estudios previos, SBSE es una buena herramienta para el análisis de la composición de CVV que son mezclas de alcoholes, aldehídos, cetonas, ácidos, terpenos, isoprenoides, ésteres, fenoles y lactonas (Yang *et al.*, 2013). Las principales muestras estudiadas fueron matrices de frutas (Yang *et al.*, 2013). Además, se realizaron numerosos estudios para la determinación de contaminantes orgánicos en matrices vegetales tales como fungicidas, organoclorados, piretroides, alquilfenoles y ftalatos, bifenoles, hidrocarburos aromáticos policíclicos, triazinas y organofosforados (Yang *et al.*, 2013). Con el fin de obtener una mayor eficiencia de extracción, se utilizó SBSE de inmersión. Sin embargo, algunos analitos no se extrajeron completamente debido a la interferencia de la matriz como resultado de la complejidad de la matriz y de la limitación del revestimiento no polar de PDMS (Yang *et al.*, 2013).

2.2- Técnicas de captura de compuestos volátiles vegetales

Las funciones vitales de los CVV en el ciclo de vida de las plantas y, por consiguiente, el creciente interés científico en la bioquímica, la fisiología y la ecología de estos metabolitos, dieron como resultado el desarrollo de técnicas de captura de CVV, basados en el muestreo del espacio aéreo que rodea las partes de la planta, denominado espacio de cabeza (HS). Estas técnicas incluyen la recolección estática y dinámica de CVV sobre un adsorbente seguido de desorción térmica o separación por extracción con solvente y análisis de mediante GC-FID y GC/MS (Dudareva *et al.*, 2006; Ormeño *et al.*, 2011; Yan *et al.*, 2014). Cabe aclarar que estas metodologías, a diferencia de las técnicas de extracción, no pueden ser comparadas en términos de rendimiento de CVV sino sólo en términos de composición relativa (Rout *et al.*, 2007).

Todas las técnicas de captura intentan identificar el perfil auténtico de CVV emitidos por una planta en el HS, sin embargo, la elección de qué sistema utilizar en un experimento particular depende del material vegetal y del problema biológico que se está investigando (Tholl *et al.*, 2006). Como primera medida, es necesario decidir si los CVV deben ser analizados a partir de plantas cultivadas en condiciones de laboratorio o en su hábitat natural. Para abordar las funciones ecológica o fisiológicamente relevantes de CVV en su hábitat natural, el análisis de CVV en campo requiere de equipos portátiles, robustos y a menudo simplificados (Tholl *et al.*, 2006). En contraposición, la configuración del sistema en condiciones de laboratorio puede incluir el análisis de CVV en las muestras utilizando dispositivos que reduzcan la contaminación y controlen con precisión, la temperatura, la intensidad de la luz, el fotoperiodo y la humedad relativa (Tholl *et al.*, 2006).

Los volátiles se pueden recoger *in situ* a partir de plantas enteras o de las partes aisladas u órganos de las plantas (Tholl *et al.*, 2006). Este último caso se aplica, por ejemplo, para distinguir los volátiles de los tejidos reproductivos y vegetativos, determinar las emisiones de CVV inducidas por el estrés como respuestas locales o sistémicas, o para correlacionar las emisiones de CVV con las actividades enzimáticas específicas de los tejidos (Tholl *et al.*, 2006).

En la mayoría de las técnicas de captura, los CVV emitidos tienen que ser muestreados y concentrados antes del análisis subsiguiente (Tholl *et al.*, 2006; Ormeño *et al.*, 2011; Yan *et al.*, 2014). En este sentido, el muestreo del espacio de cabeza es un método no destructivo para recoger volátiles, brindando una imagen más realista del perfil volátil emitido por las

plantas, lo que es más adecuado para muchas aplicaciones ecológicamente relevantes (Dudareva *et al.*, 2006; Tholl *et al.*, 2006).

2.2.1- *Análisis del espacio de cabeza dinámico*

El análisis del espacio de cabeza HS implica el análisis directo de los volátiles en la fase gaseosa por encima de una muestra vegetal (Rouseff & Cadwallader, 2001; Kolb & Ettre, 2006). Existen dos formas de análisis del HS: el análisis en el HS dinámico y del estático. En *el HS dinámico*, el gas portador es barrido sobre la superficie de la muestra o burbujead a través de una muestra líquida, mientras que en *el HS estático* o en equilibrio, los volátiles se equilibran dentro de las diversas fases presentes en la muestra (Rouseff & Cadwallader, 2001; Kolb & Ettre, 2006).

La técnica de HS dinámico es principalmente un método continuo de extracción de gas que separa los constituyentes volátiles de la matriz de la muestra mediante el flujo continuo de un gas inerte, ya sea por encima de una muestra sólida o líquida, o por burbujeo a través de una muestra líquida (Figura 2.11). En todos los casos, los volátiles son arrastrados hacia una trampa que puede ser un dedo frío, donde los volátiles se condensan, o, más comúnmente, un cartucho con un adsorbente. Los compuestos atrapados son finalmente liberados ya sea por desorción térmica y transferidos por el gas portador hacia la columna cromatográfica, o por desorción líquida, siendo el líquido luego analizado por GC (Kolb & Ettre, 2006).

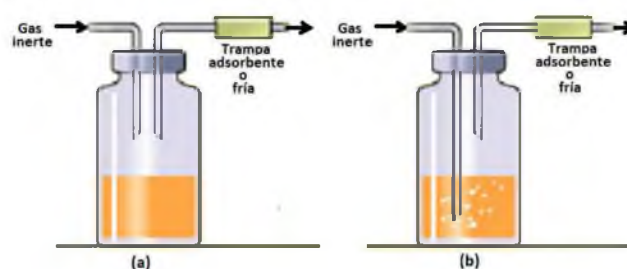


Figura 2.11. Análisis del espacio de cabeza dinámico: (a) flujo de gas por encima de una muestra sólida o líquida; y (b) burbujeo del gas a través de una muestra líquida.⁶

⁶ Fuente:

[https://chem.libretexts.org/Under_Construction/Chromedia/01Gas_Chromotography_\(GC\)/Gas_Chromotography_y%3A_In_Practice/02Gas_Chromotography%3A_Injection_techniques_and_principles/20Headspace_analysis](https://chem.libretexts.org/Under_Construction/Chromedia/01Gas_Chromotography_(GC)/Gas_Chromotography_y%3A_In_Practice/02Gas_Chromotography%3A_Injection_techniques_and_principles/20Headspace_analysis).

Se han desarrollado varias metodologías de HS dinámico, las cuales se discuten a continuación.

2.2.1.1- Purga y trampa

La técnica de purga y trampa es una variante del HS dinámico que se emplea generalmente para la extracción de CVV no polares, con puntos de ebullición inferiores a los 220 °C. La técnica consiste en hacer pasar un gas inerte a través de la muestra colocada dentro de un recipiente cerrado, la cual puede ser líquida o sólida. El gas inerte (generalmente He o N₂) arrastra a los CVV hacia una columna conteniendo una sustancia adsorbente (trampa). Después de completada la purga, en los sistemas acoplados a GC, la columna de adsorbente es calentada para provocar la desorción de CVV y, mediante un flujo invertido del gas inerte, los CVV pasan al GC acoplado para su separación y posterior detección (Sunesson *et al.*, 1992; Hung *et al.*, 2013). Este sistema se utiliza tanto para el análisis de CVV en extractos de plantas (Buttery *et al.*, 1987; Campillo *et al.*, 2005; Arceusz *et al.*, 2013), como para la emisión de volátiles de una planta o partes de ella. En este caso, se han desarrollado sistemas de purga y trampa *off line*, donde los CVV retenidos en el adsorbente son eluidos con un solvente adecuado, el cual es luego analizado (Beltran *et al.*, 2006).

Esta técnica tiene la ventaja de proveer una muestra limpia, aunque provenga de una matriz compleja y minimiza la pérdida de analitos. Sin embargo, el proceso de extracción puede llevar largos períodos de tiempo y los equipos son costosos (Hung *et al.*, 2013). La figura 2.12 muestra dos diseños de sistemas de purga y trampa.

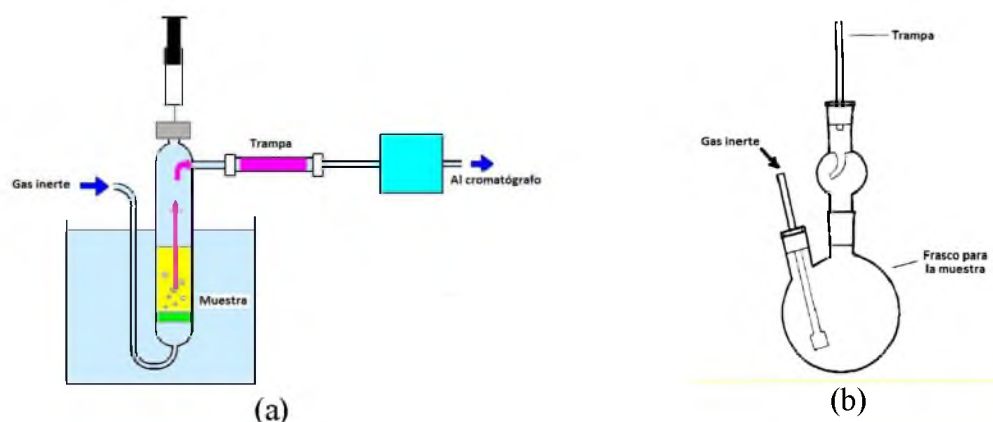


Figura 2.12. Esquema de un sistema de purga y trampa. (a) Sistema acoplado a cromatógrafo de gases;⁷ y (b) sistema *off line* (Beltran *et al.*, 2006).

⁷ Fuente: <http://slideplayer.es/slide/1055877/>

2.2.1.2- Arrastre en circuito cerrado

Una variante de muestreo en el HS dinámico es el diseñado por Donath & Boland (1995), denominado *arrastre en circuito cerrado* (CLS, del inglés *closed-loop stripping*). Los sistemas CLS tienen una amplia utilidad para el análisis de CVV inducidos por herbívoros (Dudareva *et al.*, 2005; Tholl *et al.*, 2005). En estos sistemas, las plantas o partes de la planta se colocan dentro de cámaras de vidrio y el aire del espacio de cabeza se hace circular continuamente. Dichas cámaras consisten en pequeños desecadores de vidrio de 1 a 3 L, a los que se unen bombas de circulación de aire (Figura 2.13). De este modo, los CVV son arrastrados hacia una trampa de carbón vegetal colocada en una carcasa de acero inoxidable la cual atrapa de forma cuantitativa los CVV emitidos (Donath & Boland, 1995). La desorción de CVV de la trampa se realiza mediante extracción con solventes y posterior análisis por GC. Una variante es utilizar presión o vacío suave, ya sea enfriando o calentando el inserto de la trampa con nitrógeno líquido (Kunert *et al.*, 2009).

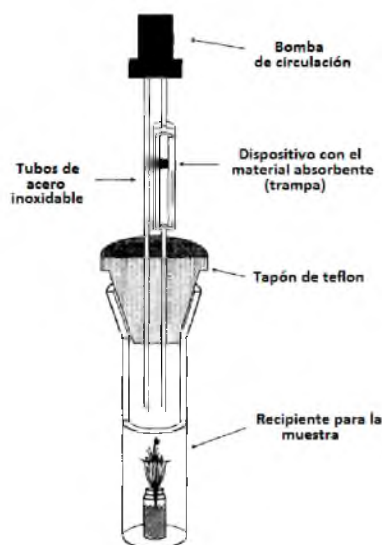


Figura 2.13. Arrastre y recolección de compuestos volátiles en un sistema de arrastre en circuito cerrado (Donath & Boland, 1995).

Las ventajas de esta técnica son: (a) dado que la circulación de aire en un sistema cerrado minimiza el atrapado de los contaminantes del aire en comparación con el flujo de aire en un sistema abierto, el sistema CLS es aplicable para el análisis de CVV de plantas con bajas emisiones volátiles; (b) los perfiles volátiles obtenidos con esta técnica mostraron una relación señal/ruido significativamente mayor en comparación con otras, debido a que retiene menor cantidad de contaminantes del aire; (c) el sistema CLS es fácil de instalar en cámaras

climáticas controladas; y (d) esta metodología hace posible recoger CVV de varias plantas individuales al mismo tiempo (Tholl *et al.*, 2006).

Las desventajas de esta técnica son: (a) los resultados de este sistema de muestreo deben compararse siempre con los obtenidos por los métodos de captura en espacio abierto para excluir artificios debidos a los efectos de la ausencia de intercambio de aire con el exterior de la cámara sobre la planta; (b) los volátiles que, como el etileno, no son atrapados en el material adsorbente, pueden acumularse en la cámara; y (c) la humedad relativa puede aumentar si no se realiza una ventilación ocasional del sistema entre los ciclos de atrapado (Tholl *et al.*, 2006).

2.2.1.3- Sistemas de extracción y de extracción y empuje

Estas técnicas también son variantes de muestreo en HS dinámico. En contraste con CLS, las *técnicas de extracción* y de *extracción y empuje* (*pull* y *pull-push systems*) operan con un flujo de aire constante que es tomado desde el exterior y arrastra a los CVV emitidos por la planta en estudio.

En un sistema de extracción (*pull system*), el aire es arrastrado desde la planta hacia una trampa adsorbente que está conectada a una bomba de vacío (Tholl *et al.*, 2006). El sistema de extracción se puede hacer en cámaras abiertas o cerradas. En las cámaras abiertas, la planta o sus partes se colocan en un recipiente que permite el flujo de aire ambiente sin limpieza previa. Este sistema se ha utilizado para investigar las emisiones volátiles inducidas por herbívoros (Halitschke *et al.*, 2000). El montaje funciona bien en las plantas que emiten grandes cantidades de volátiles, sin embargo, el riesgo de atrapar impurezas del aire ambiental es alto, lo que interferirá en el análisis de CVV (Tholl *et al.*, 2006). Cuando se realiza en cámara cerrada, por ejemplo, en recipientes de vidrio o en bolsas, por ejemplo, las utilizadas para cocción de alimentos (liberan muy pocos volátiles), se puede reducir la cantidad de impurezas del aire ambiente (Tholl *et al.*, 2006). De esta manera, el aire que entra en la cámara de recolección se hace pasar a través de un filtro de purificación antes de ingresar a la cámara (Dudareva *et al.*, 2005; Tholl *et al.*, 2006).

En los sistemas de extracción y empuje (*pull-push systems*), el aire es soplado dentro del recipiente de muestreo del espacio de cabeza a una velocidad regulada por un medidor de flujo. Antes de entrar en la cámara, el aire se limpia fluyendo a través de un filtro purificador tal como carbón adsorbente, y puede humidificarse mezclándolo con una segunda corriente de

aire saturado con humedad. Dentro del recipiente, se debe crear un flujo de aire uniforme sobre la planta. Una parte del aire se extrae de la cámara a través de una trampa de volátiles conectado a una bomba de vacío. El caudal de la corriente de salida de aire es regulado por un segundo caudalímetro, que permite la recolección de un porcentaje definido de CVV emitidos por la planta. El flujo de aire restante escapa de la cámara a través de un respiradero que evita la sobrepresión (Tholl *et al.*, 2006). En comparación con los dispositivos de extracción, este sistema ofrece más flexibilidad en la regulación del flujo de aire entrante y saliente dependiendo de las tasas de emisión de CVV de la planta investigada (Tholl *et al.*, 2006).

En ambos sistemas, los CVV retenidos en la trampa absorbente se eluyen con solventes adecuados (Halitschke *et al.*, 2000; Dudareva *et al.*, 2005, 2006; Tholl *et al.*, 2006), los cuales son finalmente analizados por GC. La figura 2.14 muestra los sistemas de extracción y de extracción y empuje.

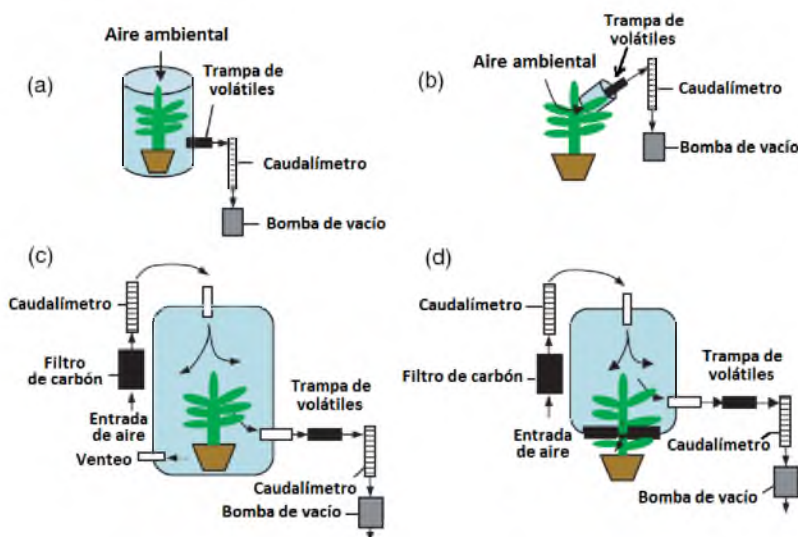


Figura 2.14. Ejemplos de sistemas de extracción y de extracción y empuje. (a) Sistema de extracción en cámara cerrada; (b) sistema de extracción en cámara abierta; (c) y (d) variantes del sistema de extracción y empuje (Tholl *et al.*, 2006).

2.2.2- Análisis del espacio de cabeza estático

En el análisis de HS estático, la muestra, sólida o líquida, se coloca en un recipiente que contiene un volumen de gas por encima. El recipiente consiste en un vial que se puede cerrar herméticamente (Kolb & Ettre, 2006). Este vial se coloca en un termostato a una temperatura constante hasta que se alcanza el equilibrio entre las dos fases (sólido-gas o líquido-gas). A continuación, se extrae una alícuota de la fase gaseosa del vial (el espacio superior o espacio

de cabeza) y se analiza por GC. La transferencia de la alícuota puede llevarse a cabo de varias maneras: ya sea manualmente, por ejemplo, utilizando una jeringa hermética a los gases, o automáticamente, mediante la presurización del vial de muestra y la transferencia controlada en tiempo o volumen de la alícuota del espacio de cabeza hacia la columna del GC acoplado (Kolb & Ettre, 2006). La figura 2.15 muestra las etapas del análisis del HS estático manual.

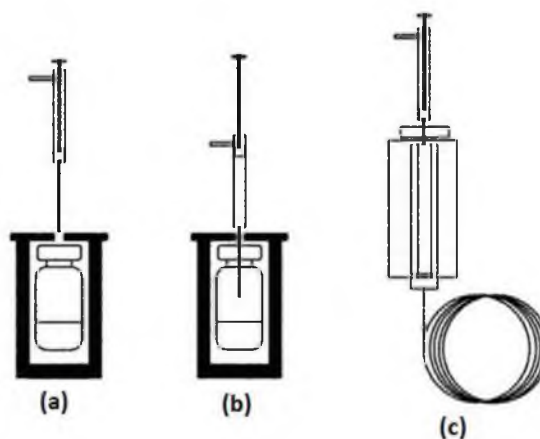


Figura 2.15. Etapas en el análisis del espacio de cabeza estático manual: (a) el sistema alcanza el equilibrio; (b) extracción del espacio de cabeza; y (c) inyección de la alícuota extraída en el cromatógrafo de gases.⁸

El análisis del HS estático directo es muy adecuado para el fraccionamiento de compuestos volátiles a partir de matrices sólidas complejas tales como materiales vegetales (Huie, 2002). Por ejemplo, se puede lograr la identificación rápida y reproducible de compuestos volátiles en plantas aromáticas cuando el muestreo del HS está acoplado a la espectrometría de masas GC-MS.

Las técnicas de análisis del HS estático directo se han utilizado para el análisis de los compuestos volátiles de *Origanum vulgare* (Garcia & Sanz, 2001) y de safrol en diferentes especies de *Asarum* (Stuppner & Ganzera, 1998). Sin embargo, en los últimos años se han desarrollado y utilizado en mayor proporción nuevas técnicas donde, en lugar de transferir una alícuota del gas del espacio de cabeza directamente en una columna de GC (HS-GC estática directa), se incluyen trampas de adsorción adicionales (Kolb & Ettre, 2006; Petronilho *et al.*, 2014) o métodos de extracción con solventes (Petronilho *et al.*, 2014; Yan *et al.*, 2014). El propósito de tales métodos es separar los analitos volátiles del exceso del gas de espacio de cabeza (Kolb & Ettre, 2006; Petronilho *et al.*, 2014). Ambos tipos de métodos son denominados de *microextracción*, que dependiendo del tipo de agente extractante puede ser

⁸ Fuente: <http://blog.cromlab.es/muestreo-por-espacio-de-cabeza-headspace-sampling-hs/>

en *fase sólida* (cuando el agente extractante es un sólido que funciona como una trampa de sorción) o en *fase líquida* (cuando el agente extractante es un líquido).

2.2.2.1- Microextracción en fase líquida del espacio de cabeza

Se han desarrollado diversas técnicas de microextracción en fase líquida (LPME) basadas en el principio de reparto o distribución (es decir, en la distribución de analitos entre la fase de microextracción y la fase de muestra que contiene los analitos) (Yang *et al.*, 2013; Yan *et al.*, 2014). La LPME integra muestreo, extracción, limpieza y concentración de analitos para su análisis posterior, y se clasifica en tres categorías principales: microextracción en una gota única (SDME), LPME de fibra hueca y microextracción líquida-líquida dispersiva (Jeleń *et al.*, 2012; Kokosa, 2013; Yang *et al.*, 2013), siendo SDME la que se aplica para el análisis de CVV en el HS (Yang *et al.*, 2013; Yan *et al.*, 2014). Sin embargo, las demás se pueden utilizar para microextracción de extractos vegetales líquidos o aceites esenciales (Jeleń *et al.*, 2012; Kokosa, 2013; Yang *et al.*, 2013; Yan *et al.*, 2014).

SDME es la más simple de las técnicas LPME. Por lo general, una microgota de solvente (0,3-3 μL) se suspende desde una jeringa para GC sobre la matriz de una muestra líquida o gaseosa (Figura 2.16) (Jeleń *et al.*, 2012; Kokosa, 2013; Yang *et al.*, 2013). Después de la extracción, la microgota se retrae de nuevo al interior de la microjeringa y luego se inyecta directamente en los instrumentos de medición (GC, LC, CE, etc.) para el análisis cuali-cuantitativo (Yang *et al.*, 2013; Yan *et al.*, 2014).

En HS-SDME, se realiza una etapa de pretratamiento que incluye el calentamiento durante un tiempo determinado de la muestra colocada dentro de un vial de cierre hermético para la evaporación de CVV, seguido de la microextracción en una gota única. Ambas etapas deben optimizarse, siendo las variables temperatura y tiempo de precalentamiento de la muestra, estudiadas en la primera etapa; mientras que en la segunda, se evalúan el volumen de la microgota y el tiempo de exposición (Sha *et al.*, 2010). Por ejemplo, para el análisis de CVV en *Nicotiana tabacum* (tabaco), las condiciones óptimas en la etapa de pretratamiento fueron 80 °C y 30 min, mientras que en la de microextracción fueron 2 μL y 90 s de exposición (Sha *et al.*, 2010).

En HS-SDME la elección del o los solventes proporciona la selectividad de la extracción, sin embargo, los solventes deben tener una baja presión de vapor, especialmente a temperaturas elevadas (Jeleń *et al.*, 2012; Yang *et al.*, 2013), ya que el factor de enriquecimiento de

volátiles extraídos se incrementa cuando disminuye la presión de vapor del solvente de extracción (Sha *et al.*, 2010).

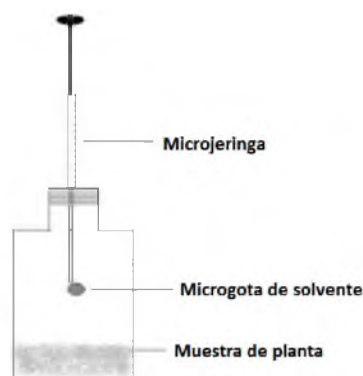


Figura 2.16. Microextracción en una gota única del espacio de cabeza (Sha *et al.*, 2010).

La HS-SDME se ha utilizado principalmente para analitos volátiles, ya que los analitos semivolátiles son más difíciles de evaporar desde la matriz de la muestra (Yang *et al.*, 2013). Con el fin de obtener mejores resultados analíticos sobre los componentes semivolátiles de las plantas, se han combinado técnicas auxiliares (microondas y ultrasonido) con técnicas HS-SDME (Yang *et al.*, 2013). Estas técnicas combinadas incluyen extracción de nebulización ultrasónica acoplada con HS-SDME (Wei *et al.*, 2011), HS-SDME asistida por microondas (Jiang *et al.*, 2010), hidrodestilación seguida por HS-SDME (Yang *et al.*, 2012) y HS-SDME con derivatización en la gota (Sha *et al.*, 2010).

La HS-SDME ha atraído considerable atención en los últimos años para la extracción de CVV debido a la posibilidad de la extracción de analitos directamente de las matrices de muestras sin un paso de pretratamiento (Jeleń *et al.*, 2012; Kokosa, 2013; Yang *et al.*, 2013; Yan *et al.*, 2014). Otra ventaja de la HS-SDME sobre los otros métodos de HS estáticos es que el perfil cromatográfico de extracción a menudo se parece mucho al del cromatograma de los analitos puros (Jeleń *et al.*, 2012). Cabe resaltar que un beneficio adicional de HS-SDME es la eliminación de los compuestos no volátiles, que podrían co-extraerse utilizando un método de extracción directa.

Las desventajas principales de HS-SDME son la susceptibilidad de la gota a desprenderse durante el proceso de muestreo por lo cual el entrenamiento y habilidad del operador son un factor determinante, la limitación del tamaño de la gota que se puede utilizar, la volatilidad del solvente de extracción y la baja capacidad para extraer analitos semivolátiles (Jeleń *et al.*, 2012; Kokosa, 2013; Yang *et al.*, 2013; Yan *et al.*, 2014). Por otra parte, es necesario destacar que estas técnicas de microextracción son útiles para HS estático, pero no para HS dinámico

debido a que la estabilidad de la gota en el extremo de la aguja de la jeringa, es muy pobre (Yang *et al.*, 2013).

2.2.2.2- Microextracción en fase sólida del espacio de cabeza

Basado en la teoría de sorción (adsorción-absorción), la microextracción en fase sólida (SPME) fue desarrollada por Arthur & Pawliszyn en 1990 como una técnica libre de solvente. En esta técnica, se produce ad/absorción y desorción de CVV en una fibra inerte revestida con diferentes tipos de ad/absorbentes (Tholl *et al.*, 2006; Ormeño *et al.*, 2011; Yang *et al.*, 2013). La fibra está dentro de la aguja de una jeringa modificada y los volátiles pueden muestrearse insertando la aguja a través de un *septum* a un recipiente de recogida del espacio de cabeza y empujando el émbolo para exponer la fibra al HS (Figura 2.17). Después del equilibrio entre la fibra y la muestra volátil (desde pocos minutos a una hora), la fibra se retrae dentro de la aguja y se puede transferir a un cromatógrafo de gases para desorción térmica directa (Yang *et al.*, 2013). La desorción térmica de CVV de la fibra elimina la necesidad de solventes que puedan contener impurezas que interfieran con el análisis de la muestra. Sin embargo, al desorber toda la muestra en el inyector, no son posibles inyecciones repetidas de la muestra (Tholl *et al.*, 2006; Ormeño *et al.*, 2011; Yang *et al.*, 2013). Las fibras de microextracción en fase sólida pueden reutilizarse aproximadamente unas 100 veces.

Aunque se trata de una técnica de equilibrio, la SPME fue rápidamente aceptada como una técnica simple, miniaturizada y ecológica (verde), que combina el muestreo, la extracción, la concentración, la limpieza y la introducción de la muestra en un solo paso (Yang *et al.*, 2013). Cabe aclarar que las fibras SPME proporcionan información semi-cuantitativa de CVV almacenados o emitidos, ya que la cantidad ad/absorbida depende de la afinidad del compuesto con el recubrimiento de la fibra, de la cantidad de sitios libres en dicho revestimiento donde los compuestos serán ad/absorbidos, y de la concentración de CVV en el espacio de cabeza (Ormeño *et al.*, 2011). Como resultado, la composición de CVV puede ser un mal representante de algunos volátiles y sobre-representar a otros (Ormeño *et al.*, 2011). Sin embargo, si se usan fibras líquidas (por ejemplo, PDMS), se elimina la limitación de la afinidad, ya que los compuestos son absorbidos por la fibra, dando resultados cuantitativos más precisos, aunque se recupere un número menor de compuestos (Ormeño *et al.*, 2011). Para cualquier recubrimiento, el tiempo de exposición de la fibra de SPME en el espacio de

cabeza y la temperatura de muestreo deben ser establecidos y reproducidos rigurosamente para obtener resultados confiables (Ormeño *et al.*, 2011; Yang *et al.*, 2013).

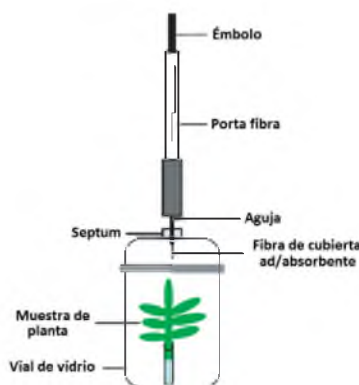


Figura 2.17. Microextracción en fase sólida del espacio de cabeza (Tholl *et al.*, 2006).

Las técnicas de HS-SPME se pueden usar para analizar CVV ya sea para partes de plantas molidas, en cuyo caso se estudian CVV almacenados, o para plantas enteras vivas, en cuyo caso se determinan los CVV emitidos (Ormeño *et al.*, 2011). En este último caso, es más difícil determinar la concentración de CVV puesto que, además de las limitaciones de la SPME, la concentración de equilibrio en la atmósfera depende de las resistencias a la transferencia de CVV desde el sitio de almacenamiento hacia el exterior. Sin embargo, HS-SPME es de gran interés como un enfoque comparativo y muestra composiciones aproximadamente equivalentes a las obtenidas por análisis de aceites esenciales obtenidos por HD o técnicas de extracción (Ormeño *et al.*, 2011). HS-SPME se utiliza tradicionalmente para determinar la mezcla de CVV emitidos por una planta, llegando algunos autores a sostener que el HS-SPME es el método de muestreo que reproduce mejor el olor genuino que se podría percibir de la planta fresca (Ormeño *et al.*, 2011; Yang *et al.*, 2013).

La SPME se ha utilizado también en sistemas de HS dinámico (Figura 2.18) para estudiar las tasas de emisión de CVV de una planta. Esta aplicación de la técnica comúnmente es menos eficiente en términos de monoterpeno y sesquiterpeno debido a las características de adsorción selectiva de algunos adsorbentes, lo cual puede ser mejorado por el uso de fibras con ad/absorbentes multi-componentes (Ormeño *et al.*, 2011). Todos los aspectos teóricos referidos a la HS-SPME se desarrollarán con mayor profundidad en el Capítulo 3.

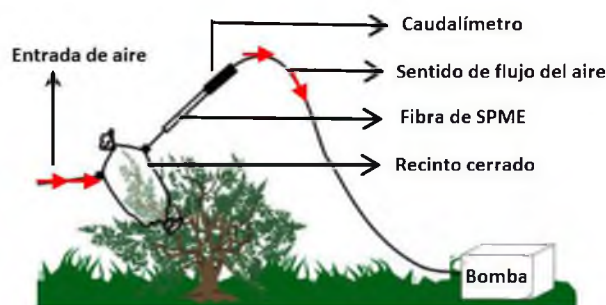


Figura 2.18. Microextracción en fase sólida del espacio de cabeza dinámico (Ormeño *et al.*, 2011).

2.3- Separación, identificación y cuantificación de compuestos volátiles por cromatografía de gases

Los CVV se analizan rutinariamente mediante la técnica estándar de GC. Una gran cantidad de literatura está disponible describiendo los protocolos de análisis de CVV por GC (Tholl *et al.*, 2006; Rubiolo *et al.*, 2010; Ormeño *et al.*, 2011; Yang *et al.*, 2013; Yan *et al.*, 2014; Kegge *et al.*, 2015; Hadi *et al.*, 2016; De Backer *et al.*, 2017).

Para el análisis de CVV por GC, las muestras se inyectan como extractos de solventes en el inyector calentado en modo *split* o *splitless*, o se desorben del ad/absorbente colocándolo directamente en un *liner* de desorción térmica, calentado a 250-300°C. La elección de la temperatura del inyector debe tomar en consideración la posible descomposición de compuestos a altas temperaturas (Tholl *et al.*, 2006; Rubiolo *et al.*, 2010).

Para fines analíticos, los CVV se separan normalmente en columnas capilares de sílice fundida con diferentes fases estacionarias, que pueden ser apolares, tales como metilpolisiloxanos (SE30, OV-1, OV 101, DB-1, HP-1, PS 347,5, entre otros) y metilfenilpolisiloxanos (SE-52, SE-54, DB-5, HP-5, PS-086, entre otros), o polares tales como las que usan polietilenglicol (PEG-20M, CW-20M, DB-Wax, entre otros) (Tholl *et al.*, 2006; Rubiolo *et al.*, 2010).

Los detectores de espectrometría de masas (MS) son el tipo de detector más popular de GC para el análisis rutinario de CVV (GC-MS) (Tholl *et al.*, 2006; Rubiolo *et al.*, 2010). En los espectrómetros de masas de la mayoría de los instrumentos GC-MS, los compuestos que salen de la columna del GC son ionizados por impacto de electrones (EI) y las moléculas y fragmentos de moléculas positivas cargadas resultantes se separan de acuerdo con su relación masa/carga (m/z) a través de una trampa de iones cuadrupolo o un filtro de masa cuadrupolar

(Tholl *et al.*, 2006). De este modo, se obtienen cromatogramas de iones totales, que proporcionan información sobre el tiempo de retención de cada compuesto y su espectro de masas, que consiste en un patrón característico de fragmentación de iones (Tholl *et al.*, 2006). Los límites de detección de los detectores MS de alta sensibilidad se encuentran en el rango de picogramos para el modo de exploración completa (*full scan mode*), esto es, exploración de iones de un amplio rango de masa molecular y pueden ser tan bajos como el rango de femtogramos en el caso de detectores de filtros de masa cuadrupolar, que sólo escanea los iones seleccionados que son representativos de un compuesto (*selected ion monitoring mode*). Para la identificación de los compuestos en el análisis de GC-MS, se pueden obtener sugerencias de bibliotecas espectrales de masas tales como las bases de datos Wiley y NIST, además de bases que proporcionan datos de índices de retención tales como el sistema de índice de Kovats, relacionados con *n*-alcanos, y Van Der Dool, entre otros (Tholl *et al.*, 2006, Rubiolo *et al.*, 2010). La identificación de todos los compuestos de una mezcla volátil no siempre es necesaria y los perfiles de CVV pueden analizarse todavía por GC-MS estándar (Tholl *et al.*, 2006). Sin embargo, los avances continuos en la tecnología de la GC seguramente mejorarán aún más la eficiencia de la separación y el tiempo de análisis incluso en el análisis de rutina (Tholl *et al.*, 2006; Rubiolo *et al.*, 2010; Sugimoto *et al.*, 2014; Lv *et al.* 2015; Nekoei & Mohammadhosseini, 2016; Benelli *et al.*, 2017; Gunawardena, 2017; Ubaid *et al.*, 2017).

El detector de ionización de llama (FID) es también muy utilizado en la determinación de CVV. El FID consiste en una pequeña llama de difusión de aire de hidrógeno que se quema, a la cual se dirigen los componentes eluidos de la columna con el flujo del gas portador. A medida que los componentes orgánicos alcanzan la llama, se forman especies cargadas eléctricamente. Las especies cargadas se recogen en un electrodo fijado a unos pocos voltios por encima de la llama, produciendo un aumento de la corriente proporcional a la cantidad de carbono en la llama. La corriente resultante es amplificada por un electrómetro (Grob & Barry, 2004). En este caso la identificación se lleva a cabo generalmente mediante datos cromatográficos como índices de Kovats, índices de retención lineales, tiempos de retención relativo, o por combinación con GC-MS (Rubiolo *et al.*, 2010). El FID es un detector universal, altamente sensible y robusto, pero es bien sabido que sus factores de respuesta con algunos compuestos no son siempre cercanos a uno. Para algunos ésteres puede ser tan alto como 1,6, en comparación con el *n*-nonano, tomado como estándar interno. El uso de la MS como detector para la cuantificación es cada vez mayor, ya que al mismo tiempo también proporciona la identificación de los componentes, aunque se debe tener en cuenta que las

abundancias de iones dependen de la estructura del analito, que es sensible a la masa molecular (Rubiolo *et al.*, 2010).

La composición cuantitativa de CVV es muy a menudo reportada en la literatura en términos de porcentaje relativo de abundancia (Rubiolo *et al.*, 2010). Otros métodos de cuantificación utilizados se basan en la determinación de la abundancia porcentual normalizada con estándar interno; y la cuantificación absoluta o verdadera de uno o más componentes (Rubiolo *et al.*, 2010). También hay que tener en cuenta que para un análisis cuantitativo confiable se debe analizar un número adecuado de muestras para obtener una composición representativa de la fracción volátil de la especie investigada, es decir, la composición promedio de al menos tres muestras diferentes (Rubiolo *et al.*, 2010).

Los resultados de abundancia porcentual relativa son correctos sólo cuando se usan para evaluar relaciones de componentes relativos dentro de la misma muestra. Cuando un grupo de muestras diferentes debe compararse, los datos sin procesar primero deben normalizarse frente a un estándar interno o externo, y el porcentaje de abundancia debe calcularse frente a un número fijo de componentes seleccionados tomados como marcadores, usualmente comunes a todas las muestras investigadas (Rubiolo *et al.*, 2010). Además, los datos de porcentaje normalizado también se pueden utilizar para el análisis de perfiles, es decir, *el procesamiento estadístico* que permite discriminar o clasificar muestras dentro de un conjunto, a través de las abundancias de un número dado de marcadores característicos. El enfoque más utilizado es el análisis multivariado, en particular el análisis de componentes principales (PCA), un método que puede explicar las diferencias dentro de un conjunto de muestras caracterizadas por un número adecuado de componentes (variables) a través de la combinación lineal de las que explican la mayor parte de la variabilidad (Rubiolo *et al.*, 2010). Por ejemplo, la figura 2.19 muestra la discriminación de PCA para el control de calidad de 93 aceites esenciales con denominación de origen de hierbabuena de provenientes de diferentes regiones (Italia y Estados Unidos), utilizando abundancias porcentuales de 28 componentes presentes en todas las muestras después de su estandarización y/o normalización con respecto a un solo estándar interno (CVV común a todas ellas). Los denominados aceites esenciales de hierbabuena italiana se distinguen perfectamente de las procedentes de los Estados Unidos, con una variabilidad total explicada por los dos componentes principales del 78% (Rubiolo *et al.*, 2010).

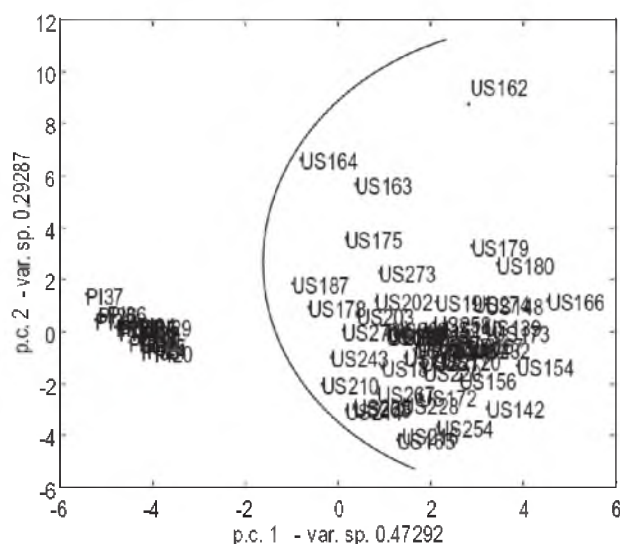


Figura 2.19. Análisis de componentes principales de los aceites esenciales de hierbabuena de Italia y de Estados Unidos (Rubiolo *et al.*, 2010).

2.4- Similitudes y discrepancias entre compuestos volátiles almacenados y emitidos

Si bien en muchos casos hay una gran similitud cualitativa y/o cuantitativa entre las emisiones de CVV y el contenido almacenado en reservorios específicos de la planta, también se han encontrado en muchos casos discrepancias (Peñuelas & Llusá, 2001; Ormeño *et al.*, 2007, 2011). Esto se puede explicar por la combinación de numerosos factores, siendo los más importantes los que dependen de la técnica empleada, los que dependen de las propiedades físico-químicas de los CVV, los factores biológicos y los factores de estrés bióticos y abióticos (Ormeño *et al.*, 2011).

2.4.1- Factores que dependen de la técnica

Las técnicas descritas en este capítulo difieren en la eficiencia con la que extraen o atrapan diferentes metabolitos y, como resultado, hay una diferencia inevitable entre los CVV que la planta almacena y luego libera, y los que están presentes dentro del extracto de la planta (Ormeño *et al.*, 2011). Además, las altas temperaturas aplicadas en algunas de las técnicas, pueden conducir a pérdidas y degradación de los compuestos más volátiles (Guillén & Ibargoitia, 1996; Ayala & De Castro, 2001, Ormeño *et al.*, 2011). Hay que tener en cuenta que, en muchos casos, las técnicas establecidas para producir aceites esenciales no buscan

minimizar las pérdidas de compuestos altamente volátiles, sino alcanzar los criterios específicos definidos para cada aceite esencial y objetivos ambientales en términos de disolventes y consumo de energía (Mejri *et al.*, 2010; Ormeño *et al.*, 2011). Por ejemplo, los aceites esenciales de *Thymbra spicata* y *Thymus mastichina* deben mostrar cantidades insignificantes de terpenos y una recuperación completa de compuestos oxigenados específicos (Hanci *et al.*, 2003). Por lo tanto, estas técnicas de obtención de aceites esenciales suelen perder CVV altamente volátiles y altamente reactivos (Ormeño *et al.*, 2011).

La molienda es también una fuente potencial de modificación del contenido real de CVV, aunque su efecto no está bien documentado (Ormeño *et al.*, 2011). Si la actividad biológica del follaje no se detiene, la trituración puede conducir a la formación enzimática y no enzimática de sustancias volátiles. Como las actividades de las enzimas terpeno-sintetasas son muy bajas a temperaturas por debajo de 5-10 °C (Niinemets *et al.*, 2002), se puede evitar este problema ya sea realizando el análisis de manera inmediata u homogeneizando el follaje sobre hielo, o en nitrógeno líquido cuando las muestras no se puedan analizar inmediatamente (Ormeño *et al.*, 2011).

Por último, el secado del follaje, a menudo llevado a cabo antes de la molienda y extracción de CVV, puede conducir a grandes pérdidas de sustancias volátiles (Ormeño *et al.*, 2011). Sin embargo, no está claro cuál es la técnica de secado más adecuada, necesaria, por ejemplo, para la obtención de aceites esenciales por técnicas de destilación. Algunos estudios afirman que la liofilización conduce a resultados satisfactorios (Ormeño *et al.*, 2011), y que el secado a temperaturas de 20 a 25 °C o superior tienen efectos cualitativos y cuantitativos sobre el aceite esencial (Mejri *et al.*, 2010). Otros estudios demuestran que el secado a temperatura ambiente o a 45 °C es más adecuado que el frizado a -198 °C antes de extraer los CVV de plantas (Díaz-Maroto *et al.*, 2003). Por lo anterior, el efecto del método de secado debería ser estudiado antes del uso rutinario para cualquier especie dada. Con el fin de evitar posibles impactos del secado, muchos trabajos publicados realizaron el estudio de CVV en plantas frescas (Ormeño *et al.*, 2011).

2.4.2- Factores que dependen de las propiedades físico-químicas de las plantas

Cada muestra de CVV presenta una cierta combinación de características físico-químicas (Niinemets *et al.*, 2004). En particular, se demostró que los coeficientes de reparto gas-líquido, procesos gobernados por la Ley de Henry; y los coeficientes de partición líquido-

líquido, típicamente caracterizados por los coeficientes de partición octanol/agua ($K_{\text{octanol/agua}}$), son las dos características físico-químicas clave que afectan la dinámica de emisión de monoterpenos específicos (Noe *et al.*, 2006). En el caso del reparto gas-líquido, la constante de la ley de Henry es la clave más importante, la cual depende de la naturaleza de los CVV, de la temperatura y de la naturaleza del líquido volátil (Duque-Tobón & Carrero-Mantilla, 2008). Por un lado, a medida que la constante de la ley de Henry disminuye (por ejemplo, para CVV oxigenados), los CVV tienden a permanecer en las soluciones acuosas dentro de las células foliares, en lugar de pasar a la fase gaseosa del medioambiente, especialmente cuando la transferencia de masa del líquido al gas es baja, como pasa cuando los estomas de las hojas están cerrados (Noe *et al.*, 2006; Ormeño *et al.*, 2011). En el caso del reparto líquido-líquido, los compuestos con alto coeficiente de partición octanol/agua tienen valores elevados de la constante de Henry, por lo que no son sensibles a las modificaciones en la transferencia de masa del líquido al gas (Copolovici & Niinemets, 2005; Noe *et al.*, 2006), y tienden a adsorberse en las superficies lipófilas de las hojas, así como también sobre la superficie del vial contenedor de la muestra (Ormeño *et al.*, 2011).

Los problemas de adsorción pueden ser particularmente significativos para compuestos de masa molecular más grandes, como por ejemplo sesquiterpenos ($C_{15}H_{24}$) y diterpenos ($C_{20}H_{36}$) (Ormeño *et al.*, 2011). Los aceites esenciales y extractos de plantas contienen grandes cantidades de estas especies de volatilidad intermedia a baja. Sin embargo, se encuentran menos frecuentemente en las emisiones de CVV, debido a su baja presión de vapor en comparación con monoterpenos (Niinemets *et al.*, 2010). Por lo tanto, aunque están altamente concentradas en las estructuras de almacenamiento específicas de las hojas, su liberación a la atmósfera está fuertemente restringida (Ormeño *et al.*, 2011). Sin embargo, en muchos casos, parece más probable que se produzcan emisiones de sesquiterpenos, pero su alta reactividad y pegajosidad en las líneas de recolección del gas impiden que lleguen al detector analítico (Ormeño *et al.*, 2011). La optimización de los diseños de los viales para las muestras y del proceso de muestreo, así como también de las propiedades de los adsorbentes empleados, pueden mejorar la recuperación de los sesquiterpenos de las muestras de plantas (Ormeño *et al.*, 2011).

2.4.3- *Factores biológicos*

La difusión pasiva no siempre es suficiente para la volatilización de los CVV hacia la atmósfera. Como se describió en el Capítulo 1, esto se debe en parte a una variedad de

factores biológicos que implican histología foliar, bioquímica y fisiología. Los CVV almacenados pueden retenerse dentro de grupos específicos debido a la alta resistencia de las paredes celulares que rodean las estructuras de reservorio. Además de estas estructuras, todos los volátiles necesitan penetrar en las membranas subcelulares y celulares para moverse desde el sitio de su síntesis o almacenamiento hasta la superficie exterior de las paredes celulares. Por ejemplo, dentro de algunas especies de la familia de la menta, que exhiben tricomas glandulares externos, se ha observado que los CVV permanecen en los depósitos específicos hasta que la cutícula se daña por abrasión (Gershenzon *et al.*, 2000). Otro ejemplo es lo que ocurre en las especies de *Pinus* que contienen cavidades secretoras internas, esto es, conductos de resina, en los cuales la resistencia a la emisión podría ser mayor que para las especies con tricomas, ya que los CVV tienen que difundir a través de varias barreras adicionales, como las capas celulares del parénquima que rodean la estructura secretora y al menos dos capas de células que rodean la cavidad, una interna de células epiteliales secretoras, y una externa de células de vaina con paredes gruesas (Ormeño *et al.*, 2011).

Un punto de vista común es que las emisiones de CVV no reflejan el contenido de CVV en especies con reservorios de almacenamiento específicos, como en el caso de las coníferas, ya que una fracción de las emisiones no proviene de la volatilización de los compuestos almacenados en los conductos de resina y sintetizados por los leucoplastos del tejido epitelial, sino que son sintetizados en los cloroplastos del tejido fotosintético de las hojas bajo condiciones de luz (Ormeño *et al.*, 2011). Aunque ha sido estudiado extensamente para muchas especies de coníferas, las emisiones de la síntesis en cloroplastos parecen estar controladas por parámetros fisiológicos relacionados con la actividad metabólica y la disponibilidad de precursores, mientras que las emisiones de las reservas foliares dependen de las propiedades fisicoquímicas (constante de Henry y coeficiente de partición octanol/agua) (Ormeño *et al.*, 2011). Estas emisiones dependientes de la luz también se producen típicamente en respuesta a una variedad de agentes de estrés biótico y abiótico, por lo que tienen una composición diferente a la de los terpenos almacenados (Ormeño *et al.*, 2011).

2.4.4- Factores de estrés bióticos y abióticos

La resistencia al flujo de difusión de CVV de las hojas descritas anteriormente es mayor en condiciones de deficiencia de agua. Las hojas desarrollan una capa epidérmica más gruesa y acumulan ceras en la cutícula para minimizar las pérdidas de agua a través de la transpiración

(Kosma *et al.*, 2009). En estas condiciones los tricomas también desarrollan cutícula y paredes celulares más gruesas, y como resultado, los CVV retenidos en la hoja tienen que superar una mayor resistencia, por lo que su liberación a la atmósfera está restringida a pesar de su alta presión de vapor (Ormeño *et al.*, 2011). Además, la formación de terpenos en respuesta a tensiones bióticas y abióticas también puede provocar diferencias entre los CVV emitidos y los almacenados. Por ejemplo, en términos de interacciones bióticas, cuando la planta es atacada por un herbívoro, los CVV almacenados en las estructuras secretoras pueden irrumpir hasta la superficie de la hoja dañada. Dicha exposición de CVV al aire libre creará una alta concentración de terpenos en el punto de ataque, por lo que es improbable que esta liberación repentina de CVV sea semejante y proporcional a las cantidades de CVV almacenadas (Ormeño *et al.*, 2011).

Por lo descrito en el presente capítulo, en los últimos años se han realizado enormes progresos en el análisis de volátiles de plantas, a través del desarrollo de técnicas modernas para la determinación de CVV en tiempo real, el monitoreo de cambios rápidos y sutiles de las emisiones en respuesta a factores abióticos o bióticos, así como para la extracción de CVV de reservorios de almacenamiento. Estos avances han permitido dilucidar algunos mecanismos de interacción bióticos y abióticos, proveyendo de técnicas analíticas capaces de igualar o incluso superar a las técnicas genómicas y proteómicas contemporáneas (Danlami *et al.*, 2014), y dando correlaciones precisas con la bioquímica que subyace a la biosíntesis y la regulación de los CVV (Tholl *et al.*, 2006; Danlami *et al.*, 2014; Kegge *et al.*, 2015). Los recientes desarrollos han reducido los límites de detección y mejoraron las eficiencias de preparación de las muestras, así como la separación de analitos y los factores de respuesta en el tiempo. Por lo tanto, posiblemente también permitirán detectar transgénicos, mutantes o variantes naturales con perfiles de emisión CVV alterados (Sugimoto *et al.*, 2014), especialmente en combinación con análisis estadísticos multivariados. Por esa razón, técnicas optimizadas para CVV específicos biológicamente activos son cada vez más necesarias, en especial para aquellas plantas de importancia económica (Rubiolo *et al.*, 2009), las cuales darán la posibilidad de investigar múltiples aspectos y áreas aún inexploradas de la biosíntesis, la emisión y la función de los CVV.

Capítulo 3

Análisis de compuestos volátiles por Microextracción en Fase Sólida del Espacio de Cabeza (HS-SPME)

-
- 3.1- Análisis del espacio de cabeza.
 - 3.1.1- Factores que afectan la concentración de analitos en el espacio de cabeza.
 - 3.1.1.1- Influencia de la temperatura sobre la concentración de volátiles en el espacio de cabeza.
 - 3.1.1.2- Influencia del volumen de muestra sobre la concentración de analitos en el espacio de cabeza.
 - 3.1.1.3- Influencia de la matriz de la muestra por variación del coeficiente de actividad sobre la concentración de analitos en el espacio de cabeza.
 - 3.1.2- Equilibrado del espacio de cabeza.
 - 3.2- Microextracción en fase sólida del espacio de cabeza.
 - 3.2.1- Teoría de la microextracción en fase sólida.
 - 3.2.1.1- Factores que afectan la microextracción en fase sólida.
 - 3.2.1.1.1- Volumen de la fase extractante.
 - 3.2.1.1.2- Coeficiente de partición del analito entre la fase extractante y la muestra.
 - 3.2.1.1.3- Matriz de la muestra.
 - 3.2.1.2- Cinética de la microextracción en fase sólida.
 - 3.2.1.3- Tipos de recubrimientos de las fibras de microextracción en fase sólida.
 - 3.2.1.4- Desorción de analitos extraídos.
 - 3.2.2- Aspectos metodológicos de la microextracción en fase sólida del espacio de cabeza.
 - 3.2.2.1- Viales para la muestra.
 - 3.2.2.2- Fibras comerciales de microextracción en fase sólida.
 - 3.2.2.3- Procedimiento general de análisis.
 - 3.2.2.4- Optimización del proceso de muestreo.
 - 3.2.2.3.1- Selección del tipo de fibra.
 - 3.2.2.3.2- Selección de la temperatura de trabajo.
 - 3.2.2.3.3- Selección de tiempos de equilibrado del espacio de cabeza y de extracción.
 - 3.2.3- Aplicaciones de la microextracción en fase sólida del espacio de cabeza.
-

Como se pudo observar en el Capítulo 1, los CVV han sido y son profundamente estudiados no sólo debido a que muchos de ellos son muy utilizados comercialmente como aromas y fragancias en la industria de alimentos y perfumes, sino también para determinar su rol en la fisiología y la ecología de las plantas (Ormeño *et al.*, 2011; Dudareva *et al.*, 2013; Yang *et al.*, 2013; Yan *et al.*, 2014; De Backer *et al.*, 2017). Este creciente interés científico en la bioquímica, la fisiología, la ecología y la química atmosférica de los CVV ha llevado al desarrollo de una variedad de sistemas para la recolección y análisis de volátiles (Ormeño *et al.*, 2011; Dudareva *et al.*, 2013; Yang *et al.*, 2013; Yan *et al.*, 2014), siendo las técnicas desarrolladas en los últimos años de análisis en el espacio de cabeza las que proporcionan un

perfil de los volátiles más representativos de las plantas vivas que los métodos tradicionales de extracción con solvente o destilación con vapor de agua (Ormeño *et al.*, 2011; Dudareva *et al.*, 2013), tal como se describió en el Capítulo 2. En este sentido, la microextracción en fase sólida del espacio de cabeza (HS-SPME), se ha convertido en una herramienta de muestreo muy utilizada para la investigación de CVV (Yang *et al.*, 2013) tanto en los reservorios como en la emisión de los mismos como respuesta a interacciones bióticas y abióticas (Ormeño *et al.*, 2011; Dudareva *et al.*, 2013).

A continuación, en el presente capítulo, se desarrollarán los aspectos teóricos y metodológicos de la técnica HS-SPME.

3.1- Análisis del espacio de cabeza

La cromatografía del espacio de cabeza (HS) se desarrolló a finales de los años 60 para determinar el contenido de alcohol en sangre y se ha convertido en un procedimiento analítico importante para determinar la composición de compuestos volátiles en una amplia gama de materiales. Esta técnica ha sido ampliamente empleada en análisis de CVV con diversas finalidades (Kolb & Ettre, 2006; Ormeño *et al.*, 2011; Dudareva *et al.*, 2013).

El análisis del HS estático implica la determinación de los compuestos volátiles en la fase gaseosa que se encuentra por encima de una muestra (Rouseff & Cadwallader, 2001; Kolb & Ettre, 2006). La Figura 3.1 presenta un vial con las dos fases: la fase de muestra (condensada, V_s) y la fase de gas (espacio de cabeza, V_g), indicados por los respectivos subíndices S y G.

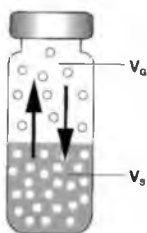


Figura 3.1. Vial de espacio de cabeza que contiene una muestra líquida: V_G = volumen de la fase gaseosa, V_S = volumen de la muestra líquida (Kolb y Ettre., 2006).

Si el sistema contiene analitos volátiles que son solubles en la fase de la muestra (fase condensada), éstos se distribuirán entre ambas fases de acuerdo con su equilibrio termodinámico. El sistema representado por el vial de la Figura 3.1 se caracteriza por las siguientes variables (Kolb & Ettre, 2006):

V_V = Volumen total del vial.

V_S = Volumen de la fase de la muestra.

V_G = Volumen de la fase gaseosa.

Dichas variables están relacionadas a través de la Ecuación 3.1.

$$V_V = V_S + V_G \quad \textbf{Ecuación 3.1}$$

Los volúmenes relativos de las dos fases en el vial se caracterizan por la relación de volúmenes de las dos fases involucradas (β):

$$\beta = \frac{V_G}{V_S} \quad \textbf{Ecuación 3.2}$$

Representando a la cantidad original del analito en la muestra como W_0 , y a su concentración original como C_0 , entonces la relación entre ellas será la que se muestra en la Ecuación 3.3.

$$C_0 = \frac{W_0}{V_S} \quad \textbf{Ecuación 3.3}$$

Después del equilibrado del HS, las cantidades respectivas del analito en las dos fases serán W_S y W_G , mientras que sus concentraciones serán C_S y C_G , (Ecuaciones 3.4 y 3.5), teniendo en cuenta que W_0 es la suma de las cantidades de analito en ambas fases después de alcanzado el equilibrio (Ecuación 3.6).

$$C_S = \frac{W_S}{V_S} \quad \textbf{Ecuación 3.4}$$

$$C_G = \frac{W_G}{V_G} \quad \textbf{Ecuación 3.5}$$

$$W_0 = W_S + W_G \Rightarrow C_0 \times V_S = C_S \times V_S + C_G \times V_G \quad \textbf{Ecuación 3.6}$$

La distribución del analito entre las dos fases del equilibrio se expresa mediante la constante de equilibrio termodinámica, esto es, el coeficiente de distribución, partición o reparto (K_D) (Ecuaciones 3.7 y 3.8).

$$K_D = \frac{C_S}{C_G} \quad \textbf{Ecuación 3.7}$$

$$K_D = \frac{W_S}{W_G} \times \frac{V_G}{V_S} = \frac{W_S}{W_G} \times \beta$$

Ecuación 3.8

El coeficiente de partición es un parámetro fundamental que expresa la distribución de masas en este sistema bifásico y depende de la solubilidad del analito en la fase de la muestra: los compuestos con alta solubilidad tendrán una alta concentración en la fase de la muestra en relación a la fase gaseosa ($C_S \gg C_G$); por lo tanto, el valor de K_D puede ser muy alto. Por otro lado, en el caso de los analitos con poca solubilidad en la fase de la muestra, C_S estará próximo a C_G e incluso puede ser inferior a su valor, por lo que en este caso K_D será pequeño (Rouseff & Cadwallader, 2001; Kolb & Ettre, 2006).

En las técnicas de análisis de HS, es importante determinar la relación entre la concentración de analito en la muestra original y la que alcanza en la fase gaseosa luego de alcanzado el equilibrio, ya que es la base de las determinaciones cuantitativas. Eso es posible a través de una combinación de las ecuaciones 3.3 a 3.8 (Ecuaciones 3.9 a 3.11) (Kolb & Ettre, 2006).

$$C_0 \times V_S = C_G \times V_G + K_D \times C_G \times V_S = C_G \times (K_D \times V_S + V_G)$$

Ecuación 3.9

$$C_0 = \frac{C_G}{V_S} \times (K_D \times V_S + V_G) = C_G \times \left(K_D + \frac{V_G}{V_S} \right) = C_G \times (K_D + \beta)$$

Ecuación 3.10

$$C_G = \frac{C_0}{(K_D + \beta)}$$

Ecuación 3.11

Dentro de un sistema de partición o distribución determinado, el valor del coeficiente de distribución se puede manipular cambiando las condiciones analíticas. Los factores que influyen en su valor dependen de tres leyes básicas: la ley de Dalton, la ley de Raoult y la ley de Henry (Rouseff & Cadwallader, 2001; Kolb & Ettre, 2006).

Según la ley de Dalton, la presión total de una mezcla de gases (P_{total}) es igual a la suma de las presiones parciales (P_i) de los gases presentes en la mezcla (Ecuación 3.12) (Rouseff & Cadwallader, 2001; Kolb & Ettre, 2006).

$$P_{total} = \sum P_i$$

Ecuación 3.12

Por su parte, la ley de Dalton establece que la fracción de la presión ejercida por un gas es igual a la fracción de su número total de moles presentes en la mezcla de gases (Ecuaciones 3.13 y 3.14). En la ecuación 3.13 n representa el número de moles presentes y X_G es la fracción molar del componente particular en la mezcla de gases.

$$\frac{P_i}{P_{total}} = \frac{n_i}{n_{total}} = X_{Gi} \quad \text{Ecuación 3.13}$$

$$P_i = P_{total} \times X_{Gi} \quad \text{Ecuación 3.14}$$

En una mezcla de gases diluidos con una composición química dada, se puede usar la concentración de ese componente en la mezcla en lugar de la fracción molar (Ecuación 3.15), donde la constante (K) incorpora el modo de conversión de fracción molar a unidades de concentración (Kolb & Ettre, 2006).

$$X_{Gi} = K \times C_{Gi} \quad \text{Ecuación 3.15}$$

Combinando las ecuaciones 3.14 y 3.15 es posible decir que la concentración del analito en el HS es proporcional a su presión parcial (Rouseff & Cadwallader, 2001; Kolb & Ettre, 2006).

En cuanto a la ley de Raoult, la misma establece que la presión de vapor de un soluto disuelto (presión parcial, P_i) sobre la solución en la que está disuelto es directamente proporcional a su fracción molar en la solución (X_{Si}) y la constante de proporcionalidad es la presión de vapor del analito puro (P_i^0) (Ecuación 3.16).

$$P_i = P_i^0 \times X_{Si} \quad \text{Ecuación 3.16}$$

La ley de Raoult es válida sólo para las mezclas ideales, y en la mayoría de los casos hay una desviación de la ley de Raoult. Para compensar esta desviación, se introduce el coeficiente de actividad (γ_i) en ecuación 3.16 (Ecuación 3.17). El coeficiente de actividad es un factor de corrección de la concentración de soluto que toma en consideración las interacciones que ocurren en las soluciones reales.

$$P_i = P_i^0 \times \gamma_i \times X_{Si} \quad \text{Ecuación 3.17}$$

El coeficiente de actividad depende de la naturaleza del componente i y refleja la interacción intermolecular entre el analito y los otros componentes de la muestra, particularmente la matriz (solvente). Por lo tanto, el denominado efecto de matriz, representa la influencia del coeficiente de actividad sobre el proceso analítico. Para concentraciones más altas del analito, el coeficiente de actividad también se convierte en una función de la concentración, mientras que en soluciones diluidas es constante e independiente de la concentración del analito (Kolb & Ettre, 2006). Las soluciones diluidas son denominadas ideales debido a que hay una relación lineal entre la presión parcial de vapor y la concentración del analito, lo que se

expresa mediante la ley de Henry (Ecuación 3.18), donde H es la constante de la ley de Henry.

$$P_i = H \times X_i \quad \text{Ecuación 3.18}$$

En una solución ideal ($\gamma_i = 1$), $H = P_i$. La ley de Henry es la base de la cromatografía gaseosa y del análisis del HS (Rouseff & Cadwallader, 2001; Kolb & Ettre, 2006). Es importante destacar que la constante de la ley de Henry depende de la naturaleza de los compuestos volátiles, de la temperatura y de la naturaleza del líquido volátil (Duque-Tobón & Carrero-Mantilla, 2008).

En una solución diluida ideal (normalmente $<0,1\%$), cada molécula del analito disuelta está rodeada solamente por moléculas de solvente. Por lo tanto, sólo son relevantes las fuerzas de interacción intermoleculares soluto-solvente, mientras que la probabilidad de interacción soluto-soluto adicional aumenta con la concentración del analito (Rouseff & Cadwallader, 2001; Kolb & Ettre, 2006).

Finalmente, si se sustituye P_i de la ecuación 3.14 en la ecuación 3.17, se obtendrá la ecuación 3.19 que puede reordenarse para dar la ecuación 3.20 (Kolb & Ettre, 2006).

$$P_i = P_{total} \times X_{Gi} = P_i^0 \times \gamma_i \times X_{Si} \quad \text{Ecuación 3.19}$$

$$\frac{X_{Si}}{X_{Gi}} = \frac{P_{total}}{P_i^0 \times \gamma_i} \quad \text{Ecuación 3.20}$$

Sabiendo que en un sistema dado de soluciones diluidas ideales la concentración de solutos puede ser sustituida por la fracción molar, el coeficiente de partición de las fases en el HS (K_D) quedará representado por ecuación 3.21, según la cual dicho coeficiente resulta proporcional al recíproco de la presión de vapor y del coeficiente de actividad del analito. Por esa razón, un aumento de estos valores disminuirá el valor del coeficiente de partición. Por otra parte, según la ecuación 3.21, una disminución en el coeficiente de partición aumentará la concentración del analito en el espacio de cabeza en equilibrio, y esto resulta en un aumento de la sensibilidad del análisis del espacio de cabeza (Rouseff & Cadwallader, 2001; Kolb & Ettre, 2006).

$$K_D = \frac{C_{Si}}{C_{Gi}} = \frac{X_{Si}}{X_{Gi}} = \frac{P_{total}}{P_i^0 \times \gamma_i} \quad \text{Ecuación 3.21}$$

A partir de la ecuación 3.21 es posible influir favorablemente en el coeficiente de partición modificando la presión de vapor y el coeficiente de actividad. De allí surgen los factores que afectan la concentración de analito en el HS y, por lo tanto, la sensibilidad de la técnica analítica (Kolb & Ettre, 2006).

3.1.1- *Factores que afectan la concentración de analitos en el espacio de cabeza*

En el análisis del HS es deseable tener una concentración de analito suficientemente alta en el equilibrio del HS, y, mientras más elevada sea, mayor será la sensibilidad analítica, independientemente de la técnica que luego se emplee para el muestreo de volátiles. En este sentido, de acuerdo con la ecuación 3.11, la concentración de analitos en el HS, y, por lo tanto, la sensibilidad del análisis, depende del efecto combinado de K_D y β . Entonces, para una concentración de muestra original dada (C_0), es posible manipular la concentración de analito en el HS (C_G) modificando los valores de K_D y β . En otras palabras, es factible cambiar la sensibilidad del análisis del HS manipulando estos dos términos. Por esta razón, es importante determinar la influencia del coeficiente de partición (K_D) y la relación de volúmenes de las fases (β) sobre los resultados analíticos (Rouseff & Cadwallader, 2001; Kolb & Ettre, 2006).

Hay dos parámetros que se pueden modificar fácilmente en todas las técnicas de análisis del HS: el volumen del vial y su temperatura. Además, también es posible afectar las propiedades químicas de la matriz de la muestra y del analito, tal como se muestra a continuación.

3.1.1.1- Influencia de la temperatura sobre la concentración de volátiles en el espacio de cabeza

La presión de vapor de un compuesto puro (P_i^0) está influenciada por su temperatura en una relación exponencial. La ecuación 3.22 muestra dicha relación, donde B y C son constantes características del compuesto y T es la temperatura absoluta (Kolb & Ettre, 2006).

$$\log P_i^0 = -\frac{B}{T} + C$$

Ecuación 3.22

La figura 3.2 presenta las variables de la ecuación 3.22 para el agua. Como puede observarse, un aumento de 20 °C en la temperatura puede aumentar la presión vapor en más del doble. Esto es debido a la naturaleza exponencial de la relación, donde incluso un pequeño cambio de temperatura puede resultar en una diferencia considerable de la presión de vapor. Por ejemplo, una diferencia de 1 °C en la temperatura da lugar a una diferencia del 4,5% en la presión de vapor (Kolb & Ettre, 2006).

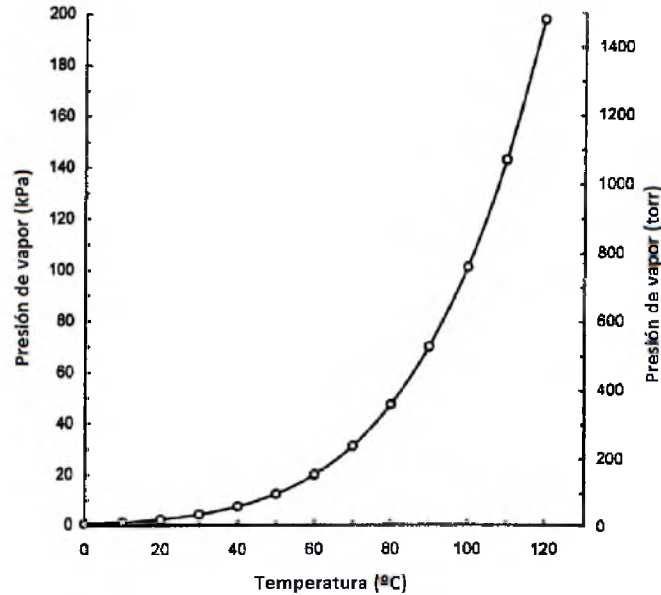


Figura 3.2. Dependencia entre la temperatura y la presión de vapor de saturación del agua (Kolb & Ettre, 2006).

Como el coeficiente de partición está relacionado con la presión de vapor (ecuación 3.21), se puede obtener su relación con la temperatura de forma similar a lo realizado para llegar a la ecuación 3.22 (Ecuaciones 3.23 y 3.24), donde *const* es el cociente entre P_{total} y γ_i (Kolb & Ettre, 2006).

$$K_D = \frac{P_{total}}{P_i^0 \times \gamma_i} = \frac{const}{P_i^0} \quad \text{Ecuación 3.23}$$

$$\log K_D = \log(const) - \log P_i^0 \quad \text{Ecuación 3.24}$$

Sustituyendo en la ecuación 3.24 P_i^0 por la ecuación 3.22, se obtiene la relación entre el coeficiente de distribución y la temperatura (Ecuación 3.25), donde $C' = C + \log(const)$.

$$\log K_D = \frac{B}{T} - C' \quad \text{Ecuación 3.25}$$

El aumento exponencial de la presión de vapor con la temperatura es particularmente evidente en una serie homóloga, donde existe una relación entre la presión de vapor (P_i^0) y el número de átomos de carbono (C_n) de las moléculas de homólogos (Ecuación 3.26), siendo a y b constantes.

$$\log P_i = -a \times C_n + b$$

Ecuación 3.26

Debido a la relación de la ecuación 3.26, una mezcla de homólogos donde todos los componentes estén presentes en igual concentración, las presiones parciales de vapor de los compuestos con menor punto de ebullición (componentes con menor número de átomos de carbono) y, por lo tanto, sus concentraciones en el HS, serán mucho más altas que las de los homólogos de mayor punto de ebullición (componentes con mayor número de átomos de carbono) (Rouseff & Cadwallader, 2001). Esto se deduce de la ecuación 3.17, que describe la relación entre la presión de vapor y la presión parcial, y de la ecuación 3.14, que relaciona la presión parcial del analito con su concentración en el HS. Por lo tanto, en el caso de los componentes de menor punto de ebullición, es mejor determinar sus concentraciones en el HS que mediante el análisis directo de la muestra original.

Con respecto al coeficiente de partición, un aumento de la temperatura reduce su valor, ya que es inversamente proporcional al aumento de la presión de vapor de acuerdo con la ecuación 3.23. Sin embargo, la concentración de analitos en el HS no depende sólo del coeficiente de partición sino también de la relación de los volúmenes de las fases (β) según la ecuación 3.11. Por lo tanto, en el caso de mantener C_0 constante, la concentración de analitos en el HS estará directamente relacionada con los cambios en $1/(K_D + \beta)$ como lo expresa la ecuación 3.11, donde un valor más alto de concentración de analito en el HS significa un valor inferior de $(K_D + \beta)$. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que los valores de K_D para diferentes compuestos pueden variar en hasta cuatro órdenes de magnitud, mientras que la relación de volúmenes de las fases (β) no suele cambiar tanto. Por ejemplo, si dentro de un vial de 20 mL se aumenta el volumen de la muestra de 1 mL a 10 mL, β cambiará de 19 a 1. Por lo tanto, podrán ocurrir los siguientes casos (Kolb & Ettre, 2006):

➤ Si $K_D \gg \beta \Rightarrow C_G = \frac{C_0}{K_D}$

En este caso, la concentración de analitos en el HS depende directamente de K_D : cuanto mayor sea la temperatura, mayor será la concentración de analitos en el HS. Por lo tanto, la relación de volúmenes de las fases tiene poca o ninguna influencia y,

como K_D cambia significativamente con la temperatura, el efecto de la temperatura sobre la concentración de analitos en el HS será considerable.

➤ Si $\beta \gg K_D \Rightarrow C_G = \frac{C_0}{\beta}$

En este caso, la concentración de analitos en el HS está determinada por el valor de la relación de volúmenes de las fases: el coeficiente de partición tiene poca o ninguna influencia. Por otra parte, la relación de volúmenes de las fases no depende de la temperatura, por lo que acá la temperatura no tiene casi ninguna influencia sobre la concentración de analitos del HS.

Por lo anterior, un aumento de la temperatura aumentará la concentración en el HS solamente de analitos con K_D altos, mientras que los compuestos con K_D bajos prácticamente no se verán afectados. Además, como el K_D es una característica del analito, entonces la influencia de la temperatura resulta ser una función específica del analito, lo que implica que deberá evaluarse para cada muestra en particular, buscando seleccionar siempre la temperatura más baja posible por las siguientes razones (Kolb & Ettre, 2006):

(a) Algunas muestras pueden ser sensibles a temperaturas más altas y pueden descomponerse u oxidarse por el aire presente en el HS.

(b) Como la presión total en el HS es la suma de las presiones parciales de todos los componentes volátiles de la muestra, en el caso de las muestras líquidas, el vapor del solvente será lo que determine principalmente la presión del HS, por lo que las concentraciones de los solutos disueltos no tendrán una contribución importante en la presión global. Así, particularmente cuando el solvente de la matriz de la muestra tenga un punto de ebullición relativamente bajo, aumentará significativamente la presión del espacio de cabeza. Por lo tanto, si se requieren solventes orgánicos, se deben preferir aquellos con puntos de ebullición más altos y trabajar a temperaturas menores a dichos puntos de ebullición para evitar la interferencia de los solventes en el análisis.

(c) Si la presión del HS en el vial es demasiado alta, pueden producirse algunos problemas instrumentales, por ejemplo, fugas de analitos a través del *septum* o incluso rotura del vial.

3.1.1.2- Influencia del volumen de muestra sobre la concentración de analitos en el espacio de cabeza

Si se expresa el tamaño relativo de la muestra como una fracción de fase de la muestra (ϕ_s) con respecto al total del vial, se obtendrá un término similar a la relación de volúmenes de fase (β), excepto que ahora dará el volumen de la muestra V_s como una fracción del volumen total del vial V_v (Ecuación 3.27) (Kolb & Ettre, 2006).

$$\phi_s = \frac{V_s}{V_v} \quad \text{Ecuación 3.27}$$

La relación de volúmenes de fase (β) y la fracción de fase de la muestra (ϕ_s) están relacionadas a través de las ecuaciones 3.28 y 3.29.

$$\phi_s = \frac{1}{1 + \beta} \quad \text{Ecuación 3.28}$$

$$\beta = \frac{1 - \phi_s}{\phi_s} \quad \text{Ecuación 3.29}$$

A partir de las ecuaciones 3.28 y 3.29, si por ejemplo un vial se llena hasta el 50 % de su volumen con la muestra, ϕ_s será 0,5; por lo que valores de ϕ_s de 0,2 y 0,8 representarán el 20 % y el 80 % del volumen del vial respectivamente (los cuales corresponderán a los valores de relación de volúmenes de fase, β , de 4,0 y 0,25 respectivamente). Es importante aclarar que podrían utilizarse volúmenes de muestra mucho más pequeños que el 20 % del vial, ya que a menudo solo unos pocos microlitros de la muestra pueden ser suficientes. Por otro lado, el 80 % es aproximadamente el límite superior ya que se necesita espacio suficiente para poder realizar el muestreo de volátiles en el HS. Para mostrar el efecto del volumen de muestra sobre la concentración de analitos en el HS se muestran cuatro ejemplos de valores del coeficiente de partición diferentes: 0,2; 1,0; 20 y 250, un vial de 20 mL y valores de ϕ_s de 0,2 y 0,8 (tabla 3.1) (Kolb & Ettre, 2006).

Tabla 3.1. Efecto del cambio de volumen de muestra sobre la concentración de analitos en el espacio de cabeza manteniendo constante el volumen del vial (Kolb & Ettre, 2006).

K_D	ϕ_s	β	$1/(K_D+\beta)$	Factor de diferencia en $1/(K_D+\beta)$
0,20	0,20	4,00	0,238	9,33
	0,80	0,250	2,222	
1,00	0,20	4,00	0,200	4,00
	0,80	0,250	0,800	
20	0,20	4,00	0,042	1,19
	0,80	0,250	0,049	
250	0,20	4,00	0,00394	1,01
	0,80	0,250	0,00400	

A partir de los valores de los ejemplos de la tabla 3.1 podrán ocurrir los siguientes casos (Kolb & Ettre, 2006):

- Si $K_D = 0,20$; cuando la muestra ocupe el 80 % del volumen del vial, la concentración del analito en el espacio de cabeza será casi 10 veces mayor que cuando la muestra ocupe sólo el 20 % del volumen del vial.
- Si $K_D = 1,0$; la concentración de analitos en el HS sigue cambiando significativamente con los cambios en el volumen de muestra ya que hay una diferencia de cuatro veces entre el 20 % y 80 % de llenado del vial por la muestra.
- Cuando $K_D = 20$; la concentración de analito en el HS difiere en un factor de sólo 1,18 para el rango dado.
- Por último, cuando $K_D = 250$; un cambio de cuatro veces en el volumen de la muestra casi no tiene influencia sobre la concentración de analitos en el HS ya que el mayor volumen de la muestra aumenta la concentración de analitos en el HS por un factor de sólo 1,02.

Por lo anterior, un aumento del volumen de muestra aumentará la concentración en el HS solamente de analitos con K_D bajos, mientras que los compuestos con K_D altos prácticamente no se verán afectados. Del mismo modo, fallas en la reproducibilidad del volumen de muestra en medidas repetidas, serán críticas sólo para valores de K_D bajos. En el caso de valores superiores, su influencia sobre la reproducibilidad de los resultados analíticos será insignificante. No obstante, dado que, en general, no se conocen los valores de coeficientes de partición, siempre es aconsejable que los volúmenes de muestra en análisis repetidos sean lo más cercanos posible (Kolb & Ettre, 2006).

3.1.1.3- Influencia de la matriz de la muestra por variación del coeficiente de actividad sobre la concentración de analitos en el espacio de cabeza

El coeficiente de actividad (γ) describe la interacción intermolecular entre el soluto y el solvente, y entre los solutos entre sí. Por lo tanto, es una propiedad tanto del analito como de la matriz de muestra. Al cambiar la matriz de la muestra, se modifica el coeficiente de actividad γ , finalmente, el coeficiente de partición y , por consiguiente, la concentración de analitos en el HS (Rouseff & Cadwallader, 2001; Kolb & Ettre, 2006).

A partir de la ecuación 3.21, el coeficiente de reparto es inversamente proporcional tanto a la presión de vapor P_i^0 como al coeficiente de actividad del analito (γ_i), por lo que, el valor del coeficiente de partición, disminuirá cuando aumente el valor del coeficiente de actividad. Un coeficiente de partición menor indica una solubilidad reducida del analito en la matriz y , por lo tanto, una concentración aumentada en el espacio de cabeza. En el caso de soluciones acuosas de compuestos polares, esto puede conseguirse añadiendo un electrolito a la muestra. Este procedimiento denominado *salting out*, se ha utilizado en química analítica y preparativa durante mucho tiempo, y para ser eficaz, se necesitan altas concentraciones de sal. Por ejemplo, cuando se estudiaron los efectos de la matriz en una solución acuosa de hidrocarburos halogenados al nivel de ppb, las concentraciones de sales de hasta el 5% no tuvieron prácticamente influencia sobre la concentración de analitos en el HS, mientras que la adición de Na_2SO_4 al 20 % a una solución 260 ppb de tricloroetileno, la concentración de analito en el HS aumentó en un 19,3%. En otro estudio del efecto de la adición de sal, se añadieron 2 g de NaCl a 5,0 mL de una mezcla en solución acuosa de dioxano (0,1 % v/v) y ciclohexano (0,002 % v/v) (Rouseff & Cadwallader, 2001; Kolb & Ettre, 2006). La adición de tal cantidad de sal inorgánica aumentó la concentración de dioxano polar en un factor de 3,22; mientras que no produjo cambios en la concentración del ciclohexano (Kolb & Ettre, 2006).

En conclusión, la salinización puede ser una forma de aumentar la concentración de analitos polares en el HS, lo cual es eficaz sólo cuando se usan concentraciones altas de sal. Un efecto similar puede obtenerse añadiendo agua a una solución de un solvente orgánico miscible con agua. Muchos compuestos orgánicos tienen mayor solubilidad en el solvente orgánico que en el agua, por lo tanto, sus concentraciones en el HS son más pobres. Tras la adición de agua sus solubilidades disminuyen, y, por lo tanto, sus concentraciones en el HS se incrementan (Kolb & Ettre, 2006). Este efecto fue utilizado por primera vez por Steichen (1976) para el análisis de residuos de 2-etilhexil acrilato en un polímero. La muestra se disolvió primero en

dimetilacetamida, y después se añadió agua a la solución. Mediante la adición de 5 mL de agua a 2 mL de la solución de dimetilacetamida, se logró un aumento de 600 veces en la concentración de 2-etilhexil acrilato en el HS.

3.1.2- *Equilibrado del espacio de cabeza*

El tiempo necesario para el equilibrado del HS depende de la difusión de los componentes volátiles de la muestra desde y hacia la muestra propiamente dicha. Sin embargo, no se puede predecir, por lo que el tiempo necesario de equilibrado debe ser establecido para las muestras en particular. Esto puede hacerse preparando varios viales con la misma muestra, manteniendo la temperatura constante para diferentes tiempos. Un ejemplo se da en la figura 3.3, donde el tiempo necesario para el equilibrio del HS es el tiempo hasta que se obtiene un área de pico constante (Rouseff & Cadwallader, 2001; Kolb & Ettre, 2006).

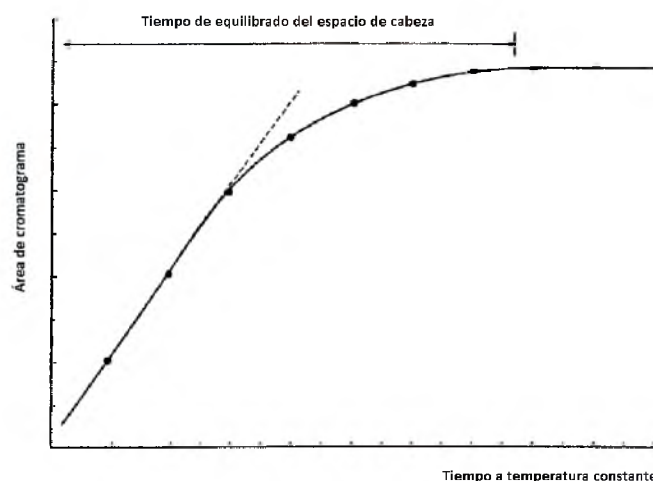


Figura 3.3. Variación del área de picos cromatográficos en función del tiempo a temperatura constante en una optimización de equilibrado del espacio de cabeza (Kolb & Ettre, 2006).

En el caso de muestras sólidas, la difusión de compuestos volátiles lleva mucho más tiempo que en muestras gaseosas o líquidas. Esto se puede observar comparando el orden de magnitud de los coeficientes de difusión, siendo de 10^{-1} en gases y de 10^{-6} en líquidos, mientras que es de 10^{-8} a 10^{-11} en sólidos (Kolb & Ettre, 2006). Por lo tanto, los tiempos de equilibrado del HS en las muestras sólidas son a menudo largos, donde el diámetro y el espesor de las partículas sólidas determinan el tiempo de difusión (Kolb & Ettre, 2006). Sin embargo, en la velocidad de equilibrado del HS también influyen la porosidad y superficie de contacto de la muestra sólida, ya que muestras sólidas porosas con una elevada superficie de

contacto con el HS tienen a menudo tiempos de equilibrado más cortos (Rouseff & Cadwallader, 2001; Kolb & Ettre, 2006). Por lo tanto, para disminuir los tiempos de equilibrado, la muestra sólida debe molerse en trozos lo más pequeños posible.

3.2- Microextracción en fase sólida del espacio de cabeza

La calidad analítica en general, y especialmente de analitos que se encuentran en niveles traza, depende principalmente del tratamiento adecuado de la muestra. Existe una demanda creciente de estrategias que minimicen las interferencias de la matriz de la muestra, especialmente en el análisis de compuestos volátiles que se producen a bajas concentraciones en matrices complejas (Nerín *et al.*, 2009). Debido a estas condiciones se requiere la reducción de los volúmenes finales de los extractos para proporcionar mayores concentraciones de analitos con bajos límites de cuantificación (Nerín *et al.*, 2009). Además, existe una demanda de procedimientos ambientalmente sustentables (Química Verde) que utilicen volúmenes reducidos de solventes orgánicos (Merkle *et al.*, 2015). Estas razones justifican la alta proporción de publicaciones científicas de los últimos años que se ocupan de innovaciones en técnicas de microextracción (Nerín *et al.*, 2009; Merkle *et al.*, 2015). Una de ellas, la microextracción en fase sólida (SPME), fue desarrollada en respuesta a dichas demandas, como un método de preparación rápida de la muestra, tanto en el laboratorio como en el sitio donde se localiza el sistema investigado, y como un método de extracción de analitos capaz de reducir la cantidad de instrumentación necesaria y disminuir el uso de solventes (Lord & Pawliszyn, 2000).

3.2.1- Teoría de la microextracción en fase sólida

La SPME se basa en la partición o distribución de analitos entre una fibra recubierta y una muestra. La fibra revestida consiste en una pequeña varilla de sílice fundida recubierta con una capa delgada de una fase extractante (figura 3.4). Tras la exposición a la fase de vapor por encima de una muestra (muestreo en el HS) o por inmersión directa en la solución de la muestra (muestreo directo), comienza un proceso de transferencia de masa desde la muestra hacia el agente extractante (Prosen & Zupančič-Kralj, 1999; Nerín *et al.*, 2009; Pawliszyn, 2012; Merkle *et al.*, 2015).

Por lo tanto, la SPME consta de dos procesos: (1) partición de los analitos entre la muestra y el revestimiento de fibra, y (2) los analitos concentrados se desorben de la fibra hacia un instrumento analítico. Para realizar la extracción, se coloca una muestra en un vial, el cual se cierra herméticamente con un septum precintado. Para muestrear, la aguja protectora de la fibra de SPME atraviesa el septum y, luego, el émbolo se baja para sumergir la fibra directamente en la muestra líquida o exponerla en el HS (Figura 3.5). Los analitos se extraen subsiguientemente desde la matriz de la muestra o desde el HS hacia el revestimiento de la fibra (Figura 3.6) (Prosen & Zupančič-Kralj, 1999; Wercinski, 1999; Nerín *et al.*, 2009; Pawliszyn, 2012; Merkle *et al.*, 2015).

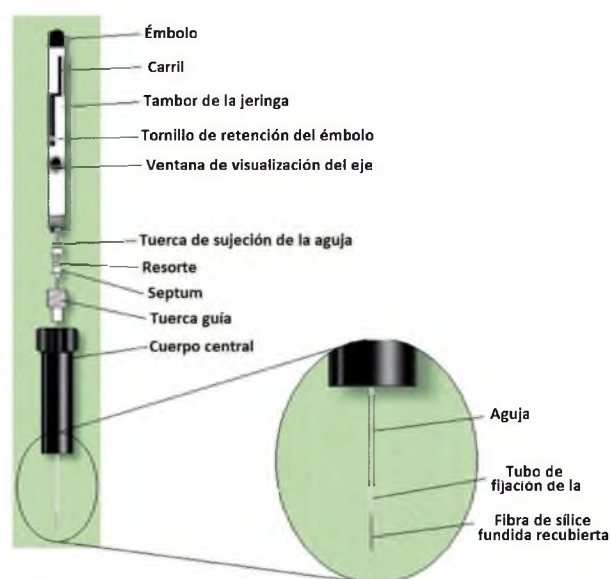


Figura 3.4. Diseño de la primera fibra comercial de microextracción en fase sólida por Supelco.¹

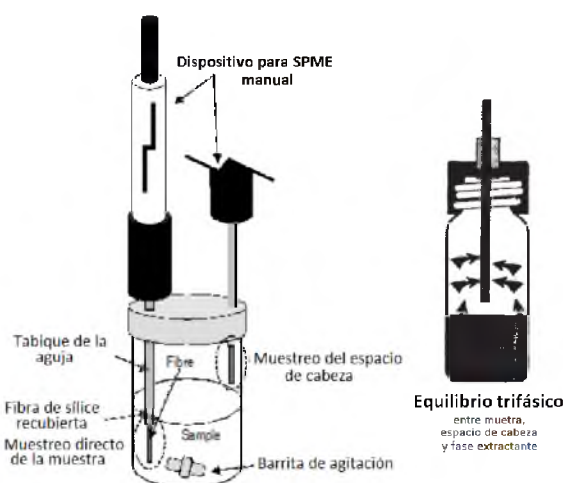


Figura 3.5. Tipos de muestreo mediante microextracción en fase sólida: por inmersión directa en la muestra líquida o en el espacio de cabeza (Wercinski, 1999; Merkle *et al.*, 2015).

¹ Fuente: <http://eprints.ucm.es/42933/1/T38815.pdf>

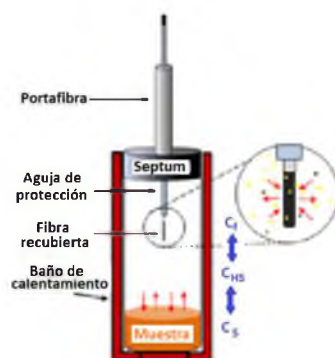


Figura 3.6. Proceso de extracción de analitos sobre el recubrimiento de una fibra de microextracción en fase sólida del espacio de cabeza. C_S , C_{HS} y C_f : cantidad de analito en la muestra, en el espacio de cabeza y en la fibra respectivamente (equilibrio trifásico). ²

El proceso de microextracción se considera completo cuando la concentración del analito alcanza el equilibrio entre la matriz de la muestra y el agente extractante sobre la fibra (Pawliszyn, 2012). Las condiciones de equilibrio pueden ser descritas por la ecuación 3.30 de acuerdo con la ley de conservación de masas, si sólo se consideran dos fases, por ejemplo, la matriz de muestra y el revestimiento de fibra en un muestreo directo (Figura 3.7) (Lord y Pawliszyn, 2000, 2012). En dicha ecuación, C_0 es la concentración inicial de analito en la matriz de la muestra, V_S es el volumen de muestra, V_f es el volumen del agente extractante, y C_S y C_f son las concentraciones de analito en la muestra y en la fase extractante respectivamente después de alcanzado el equilibrio (Pawliszyn, 2012). El coeficiente de distribución K_D del analito entre el revestimiento de fibra y la matriz de muestra se determina según la ecuación 3.31 (Pawliszyn, 2012).

$$C_0 \times V_S = C_S \times V_S + C_f \times V_f \quad \text{Ecuación 3.30}$$

$$K_D = \frac{C_f}{C_S} \quad \text{Ecuación 3.31}$$

La ecuación 3.32 muestra la relación entre la concentración de analito en la fibra y la concentración inicial en la muestra, a partir de una combinación entre las ecuaciones 3.30 y 3.31. El número de moles de analito extraídos se puede determinar a través de la ecuación 3.33. La ecuación 3.34 indica que la cantidad de analito extraído sobre el revestimiento (n) es directamente proporcional a la concentración de analito en la muestra (C_0), que es la base analítica para la cuantificación usando muestreo por SPME (Pawliszyn, 2012).

² Fuente: <http://cfhma.kz/ecobio/en/spme.html>

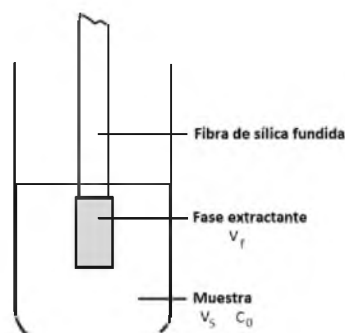


Figura 3.7. Preparación de muestra con SPME: V_f : volumen de la fase extractante sobre la fibra de sílice fundida; V_s : volumen de muestra; C_0 : concentración inicial de analito en la muestra (Pawliszyn, 2012).

$$C_f = C_0 \times \frac{K_D \times V_s}{(K_D \times V_f + V_s)} \quad \text{Ecuación 3.32}$$

$$n = C_f \times V_f = C_0 \times \frac{K_D \times V_s \times V_f}{(K_D \times V_f + V_s)} \quad \text{Ecuación 3.33}$$

Cuando el volumen de muestra es muy grande, es decir, $V_s \gg (K_D \times V_f)$, la ecuación 3.33 se puede simplificar dando la ecuación 3.34, la cual muestra la utilidad de la técnica cuando el volumen de la muestra es desconocido, ya que la cantidad de analito extraído es directamente proporcional a su concentración en la matriz, pero independiente del volumen de la muestra (Pawliszyn, 2012).

$$n = C_0 \times K_D \times V_f \quad \text{Ecuación 3.34}$$

La HS-SPME es un sistema de extracción más complejo de tres fases: el revestimiento de fibra, la fase gaseosa (HS) y la matriz de la muestra. Durante la extracción, los analitos migran entre las tres fases hasta alcanzar el equilibrio, y la masa de un analito extraído por el revestimiento de la fibra está relacionada con el equilibrio general del analito en el sistema trifásico, como muestra la ecuación 3.35, donde C_0 es la concentración inicial de analito en la matriz de la muestra, V_s es el volumen de muestra, V_f es el volumen del agente extractante, V_{HS} es el volumen del HS, y C_s , C_f y C_{HS} son las concentraciones de analito en la muestra, en la fase extractante y en el HS respectivamente después de alcanzado el equilibrio (Pawliszyn, 2012). La ecuación 3.36 representa el coeficiente de partición del analito entre la fibra y el HS, mientras que la ecuación 3.37, el coeficiente de distribución entre la muestra y el HS (Pawliszyn, 2012).

$$C_0 \times V_S = C_f V_f + C_{HS} V_{HS} + C_S V_S \quad \text{Ecuación 3.35}$$

$$K_{D(f/HS)} = \frac{C_f}{C_{HS}} \quad \text{Ecuación 3.36}$$

$$K_{D(HS/S)} = \frac{C_{HS}}{C_S} \quad \text{Ecuación 3.37}$$

Combinando las ecuaciones 3.35, 3.36 y 3.37, y sabiendo que la masa de analito extraído en la fase extractante es $n = C_f \times V_f$, se obtiene la ecuación 3.38 (Pawliszyn, 2012).

$$n = C_0 \times \frac{K_{D(f/HS)} \times K_{D(HS/S)} \times V_S \times V_f}{(K_{D(f/HS)} \times K_{D(HS/S)} \times V_f + K_{D(HS/S)} \times V_{HS} + V_S)} \quad \text{Ecuación 3.38}$$

La figura 3.8 muestra el reparto del analito entre las tres fases como una situación de equilibrio simultáneo, y la obtención del coeficiente de partición del analito entre la fibra y la muestra ($K_{D(f/S)}$).

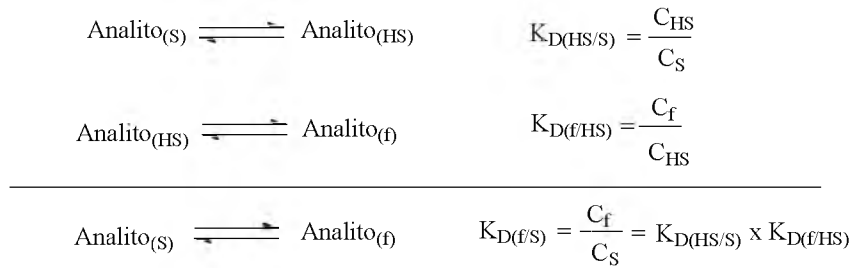


Figura 3.8. Equilibrio de distribución del analito en un sistema trifásico: S: muestra; HS: espacio de cabeza y f: fase extractante.

A partir del coeficiente de partición del analito entre la fibra y la muestra ($K_{D(f/S)}$), la ecuación 3.38 se puede transformar en la ecuación 3.39 (Pawliszyn, 2012).

$$n = C_0 \times \frac{K_{D(f/S)} \times V_S \times V_f}{(K_{D(f/S)} \times V_f + K_{D(HS/S)} \times V_{HS} + V_S)} \quad \text{Ecuación 3.39}$$

La ecuación 3.39 indica, como es de esperarse en las condiciones de equilibrio, que la cantidad de analito extraído en la fase extractante es independiente de la ubicación de la fibra en el sistema, esto es, puede colocarse tanto en el espacio de cabeza como directamente en la muestra, siempre que los volúmenes del revestimiento de fibra, el espacio de cabeza y la muestra se mantengan constantes (Pawliszyn, 2012).

3.2.1.1- Factores que afectan la microextracción en fase sólida

3.2.1.1.1- Volumen de la fase extractante

Como muestran las ecuaciones 3.34 y 3.39, se pueden modificar varios parámetros para aumentar la sensibilidad de la técnica, esto es, en definitiva, aumentar la cantidad de analito extraído. En este sentido, las variables que más fácilmente se pueden manipular son *el volumen de la fase extractante y el coeficiente de distribución del analito entre la fibra y la muestra* (Wercinski, 1999; Pawliszyn, 2012).

Con respecto al volumen de la fase extractante, si se aumenta el espesor del revestimiento de la fibra (V_f), aumentará la cantidad de analito extraído, ya que, como indican las ecuaciones 3.34 y 3.39, y manteniendo todo lo demás constante, duplicar el revestimiento de fibra puede duplicar la masa de analito extraída (Wercinski, 1999). La figura 3.9 muestra el efecto del volumen del recubrimiento de la fibra sobre la cantidad de benceno extraído desde una solución acuosa, donde la curva A es la de mayor volumen de fase extractante (100 μm), mientras que C es la curva con menor volumen (15 μm) (Wercinski, 1999).

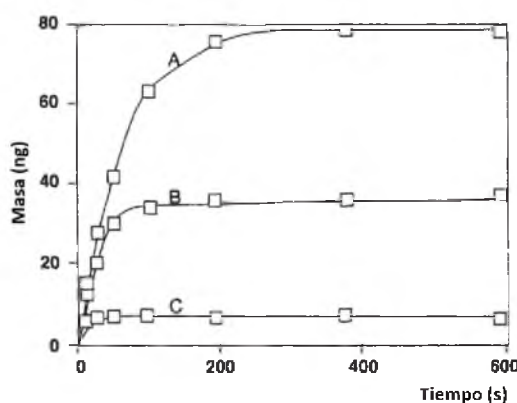


Figura 3.9. Efecto del espesor del revestimiento de la fibra en función del tiempo para la extracción de 0,1 ppm de benceno desde una solución acuosa agitada de 2,500 rpm. Parámetros: (A) revestimiento de 100 μm de espesor; (B) revestimiento de 56 μm de espesor, y (C) revestimiento de 15 μm de espesor (Wercinski, 1999).

Como se puede apreciar en la figura 3.9, el revestimiento más grueso también aumenta el tiempo para que el sistema alcance el equilibrio debido a que la extracción de mayor cantidad de analitos en un volumen mayor de fibra requiere más tiempo (Wercinski, 1999). No obstante, cabe aclarar que es recomendable utilizar el espesor de fibra más delgado posible que logre el nivel de sensibilidad deseado, ya que de ese modo el tiempo de extracción será

menor. Otra opción para aumentar el volumen del revestimiento de la fibra es aumentar la longitud de la fibra. Existen fibras comerciales de 1 y 2 cm de largo (Wercinski, 1999).

3.2.1.1.2- Coeficiente de partición del analito entre la fase extractante y la muestra

El coeficiente de partición del analito entre la muestra y el recubrimiento de la fibra ($K_{D(f/S)}$) también afecta la cantidad de analito extraído ya que, como se puede apreciar en las ecuaciones 3.34 y 3.39, si se aumenta el $K_{D(f/S)}$, se aumentará la cantidad de analito extraído y, por lo tanto, la sensibilidad de la técnica. Esto es posible ya sea modificando la afinidad de la fase extractante por el analito o la temperatura del sistema (Wercinski, 1999; Pawliszyn, 2012).

(a) Afinidad de la fase extractante por el analito

La selectividad del revestimiento de la fibra para ciertos analitos específicos puede mejorarse modificando la estructura química del polímero. La figura 3.10 ilustra este concepto mostrando el perfil de extracción de tres componentes diferentes sobre la misma fase extractante, cada uno con una constante de distribución diferente y manteniendo todos los demás parámetros constantes. El compuesto de la gráfica A (*p*-xileno), cuyo $K_{D(f/S)}$ es el más alto, produce la mayor respuesta porque tiene una afinidad mucho mayor por el revestimiento de fibra (Wercinski, 1999).

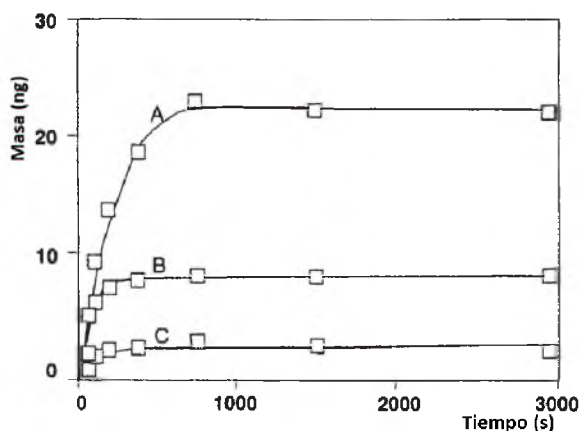


Figura 3.10. Efecto de la afinidad de la fase extractante sobre la extracción de muestras de 0,1 ppm de tres analitos diferentes: (A) *p*-xileno, $K_{D(f/S)} = 831$; (B) tolueno, $K_{D(f/S)} = 294$; y (C) benceno, $K_{D(f/S)} = 125$ (Wercinski, 1999).

Para asegurar una buena afinidad de la fase extractante por el analito, la composición del recubrimiento de la fibra debe optimizarse en cada caso (Pawliszyn, 2012).

(b) Temperatura

La temperatura de la muestra desempeña un papel clave en la sensibilidad de la técnica ya que también modifica el coeficiente de distribución, $K_{D(f/s)}$. Si la temperatura de la muestra y de la fibra cambia de T_0 a T , la constante de distribución cambia de acuerdo con las ecuaciones 3.40 y 3.41, donde $K_{D(f/s)T}$ y $K_{D(f/s)0}$ son las constantes de distribución del analito entre la muestra y la fase extractante cuando la fibra y la muestra están a la temperatura T y T_0 (en grados Kelvin) respectivamente, ΔH es el cambio de la entalpía del analito cuando es transferido desde la muestra hacia el revestimiento de la fibra y R es la constante de los gases ideales. El cambio de entalpía, ΔH , se considera constante dentro de los rangos de temperatura típicos de los experimentos con SPME (Pawliszyn, 2012). Este efecto se puede observar en la figura 3.11.

$$K_{D(f/s)T} = K_{D(f/s)0} \left[-\frac{\Delta H}{R} \times \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_0} \right) \right] \quad \text{Ecuación 3.40}$$

$$\log K_{D(f/s)T} = \log K_{D(f/s)0} \times \left[-\frac{\Delta H}{R} \times \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_0} \right) \right] \quad \text{Ecuación 3.41}$$

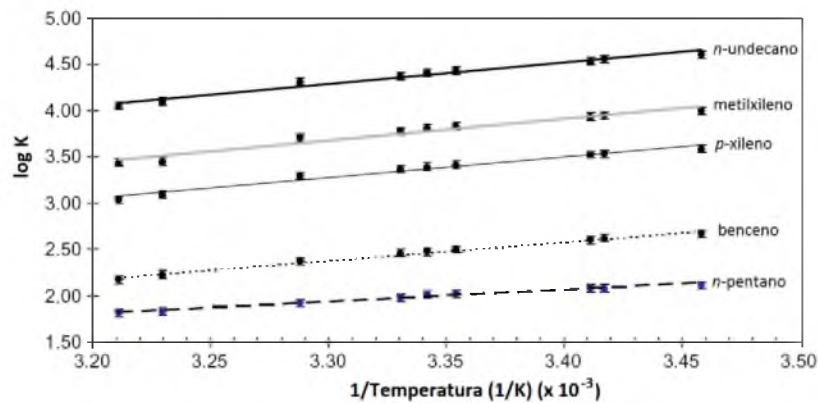


Figura 3.11. Efecto de la temperatura sobre el coeficiente de partición del analito entre la fase extractante de la fibra y la muestra (Pawliszyn, 2012).

Es importante tener en cuenta que, cuando el valor del $K_{D(f/s)}$ de un analito es mayor que 1, el analito tiene una energía potencial menor en el revestimiento de fibra que en la muestra, de modo que la partición del soluto dentro de la fibra es un proceso exotérmico, lo que implica

que el ΔH es negativo cuando el analito se mueve desde la muestra hacia el revestimiento de la fibra. En este caso, un aumento de la temperatura del sistema, disminuirá el $K_{D(f/s)}$. En el caso contrario, esto es, cuando el valor del $K_{D(f/s)}$ de un analito es menor que 1, un aumento de temperatura del sistema, aumentará el $K_{D(f/s)}$ (Pawliszyn, 2012). En general, *un aumento de la temperatura de la muestra aumenta la microextracción de los componentes de mayor punto de ebullición (alto peso molecular), mientras que disminuye la de los componentes de menor punto de ebullición (menor peso molecular)* (Wercinski, 1999).

Sin embargo, es importante considerar que en HS-SPME, hay dos procesos implicados: la liberación de analitos desde la matriz de la muestra y la ab/adsorción de los mismos en el revestimiento de fibra. Suponiendo que la mayoría de las moléculas de analito pueden ser liberadas en el HS durante el proceso de extracción, es posible simplificar la HS-SPME como un proceso de dos fases: el revestimiento de fibra y el espacio de cabeza. La extracción a temperaturas elevadas aumenta la constante de la ley de Henry (H) (Ecuación 3.18), aumentando las concentraciones de los analitos en el HS. Esto da como resultado una extracción rápida por parte de la fase extractante (Duque-Tobón & Carrero-Mantilla, 2008; Pawliszyn, 2012). Sin embargo, el coeficiente de distribución del analito entre el recubrimiento de la fibra y la muestra puede disminuir en muchos casos con el aumento de la temperatura, lo que dará como resultado una reducción de la cantidad de soluto extraído (Pawliszyn, 2012). Para evitar esta pérdida de sensibilidad, la temperatura de extracción debe optimizarse en cada caso particular.

3.2.1.1.3- Matriz de la muestra

Dos complicaciones potenciales se observan cuando se microextraen analitos de matrices complejas. Uno está asociado con la competencia entre las diferentes fases del analito y el otro, con la presencia de macromoléculas interferentes en el proceso de microextracción, tales como proteínas y materiales húmicos de la interface que interaccionan con los analitos volátiles, reduciendo así la cantidad de analito capaz de ser extraído y, por lo tanto, la sensibilidad de la técnica (Pawliszyn, 2012).

Con respecto a la competencia entre fases, cuando los analitos están en muestras heterogéneas se particionan entre varias fases, incluyendo HS, líquidos inmiscibles y sólidos, dejándolos menos disponibles para la extracción (Pawliszyn, 2012). Este efecto depende de la afinidad del analito por las diferentes fases y del volumen de las fases competidoras (Pawliszyn, 2012).

Del mismo modo que se dedujo la ecuación del coeficiente de distribución del analito entre la fase extractante y la muestra en un sistema trifásico (figura 3.8), cuando el sistema es multifásico, la $K_{D(f/S)}$ será como muestra la ecuación 3.42, donde $K_{D(f1)}$ a $K_{D(fn)}$ son los coeficientes de partición del analito entre las fases 1 y n (Pawliszyn, 2012). Por lo tanto, la cantidad de analito extraído por la fase extractante en un sistema multifásico se puede determinar por la ecuación 3.43, similar a la ecuación 3.39 (Pawliszyn, 2012).

$$K_{D(f/S)} = K_{D(f1)} \times K_{D(f2)} \times K_{D(f3)} \times \dots \times K_{D(fn)} = \prod_{i=1}^{i=n-1} K_{D(fi)} \quad \text{Ecuación 3.42}$$

$$n = \frac{K_{D(f/S)} \times V_f \times C_0 \times V_S}{K_{D(f/S)} \times V_f + \sum_{i=1}^{i=n} K_{D(i/S)} \times V_i + V_S} \quad \text{Ecuación 3.43}$$

Como se demuestra en la ecuación 3.43, la capacidad del recubrimiento de una fibra para extraer un analito, está relacionada con: (a) la constante de distribución ($K_{D(f/S)}$) del analito entre esa matriz de muestra particular y el revestimiento de la fibra, la cual es independiente del número de fases existentes durante la extracción; y (b) las capacidades de las otras fases presentes en la muestra para retener al analito (Pawliszyn, 2012). Si las capacidades de esas fases intermedias son pequeñas en comparación con la fase extractante, la masa del analito extraído no se verá afectada de manera significativa. Sin embargo, se debe enfatizar que, si las fases intermedias son líquidas y el analito tiene bajos coeficientes de difusión entre ellas, la transferencia de masa puede ser lenta y el proceso de extracción estará cinéticamente limitado (Pawliszyn, 2012).

Con respecto a la presencia de interferentes en la matriz de la muestra, es posible mejorar el proceso de extracción agregando una fase apropiada con alta afinidad hacia las interferencias, pero no hacia los analitos, y de ese modo, eliminar compuestos interferentes (Pawliszyn, 2012). En este caso, el HS entre la muestra y la fase extractante de la fibra es también una barrera de separación muy efectiva de los interferentes, ya que los analitos deben ser transportados a través de la barrera gaseosa para alcanzar el recubrimiento de la fibra, dando como resultado la exclusión de los componentes no volátiles de la matriz (Figura 3.12) (Pawliszyn, 2012). Sin embargo, cuando el volumen del HS es demasiado grande, las tasas de extracción pueden ser muy bajas para los analitos poco volátiles y polares debido a sus pequeñas constantes de la ley de Henry, aunque también para los altamente volátiles debido a que tienen una alta afinidad por la fase gaseosa, donde se concentran (Pawliszyn, 2012).

Debido a esto, el efecto del HS sobre la cantidad de analitos extraídos y, por lo tanto, sobre la sensibilidad de la técnica, se puede minimizar reduciendo su volumen (Pawliszyn, 2012).

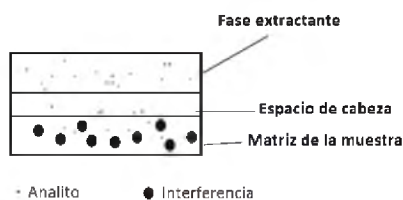


Figura 3.12. El espacio de cabeza como barrera que impide el paso de interferencias desde la matriz de la muestra hacia la fase extractante de la fibra (Pawliszyn, 2012).

Es interesante destacar que la ecuación 3.43 indica un aspecto importante del método SPME: las variaciones de la composición de la matriz afectan directamente las cantidades de analito extraído, por lo que es necesaria la optimización de la técnica para cada matriz de muestra particular, especialmente en el caso de matrices biológicas (Pawliszyn, 2012).

3.2.1.2- Cinética de la microextracción en fase sólida

La teoría cinética se utiliza para identificar los factores limitantes de la tasa de extracción por SPME y, por lo tanto, indica estrategias para aumentar la velocidad de la extracción (Ouyang *et al.*, 2011). El proceso de SPME generalmente sigue el perfil cinético mostrado en la figura 3.13, donde se puede observar que, inmediatamente después del contacto de la fibra con la muestra (en el caso de SPME directa, esto es, en un sistema bifásico), hay un rápido aumento en la masa ab/adsorbida por la fibra. La tasa de aumento luego se ralentiza y finalmente alcanza el equilibrio. Si el tiempo de muestreo es menor que t_{95} , la extracción es un proceso cinético, y hay una captación de masa casi lineal cuando el tiempo de muestreo es menor que t_{50} . Dado que el tiempo necesario para alcanzar el equilibrio es infinitamente largo, en la práctica, se supone que el tiempo de equilibrio de la extracción se alcanza cuando se extrae el 95% de la cantidad de equilibrio de un analito (Ouyang *et al.*, 2011).

Para entender la cinética del proceso de SPME, se utiliza un modelo de capa límite, según el cual existe una delgada capa límite alrededor de la fibra que es homogénea y donde la velocidad de transferencia de masa depende de la difusión del soluto a través de dicha capa límite (Ouyang *et al.*, 2011). Así, el tiempo de equilibrio de la extracción se puede estimar a partir de la ecuación 3.44 (Ouyang *et al.*, 2011; Pawliszyn, 2012), donde δ es el espesor de la capa límite que rodea el revestimiento de la fibra, $(b-a)$ es el espesor del revestimiento de la

fibra, y D_s es el coeficiente de difusión del analito en la matriz de muestra (Ouyang *et al.*, 2011).

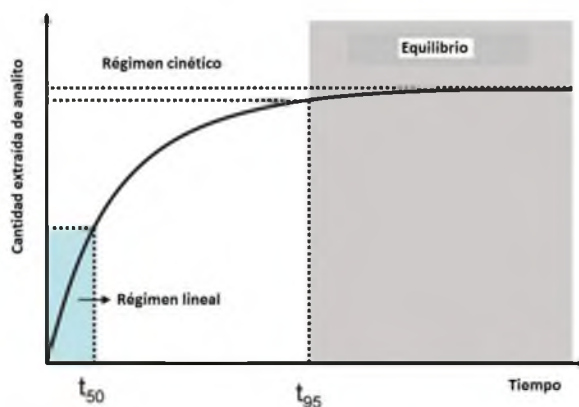


Figura 3.13. Perfil típico del tiempo de extracción por microextracción en fase sólida (Ouyang *et al.*, 2011).

De acuerdo con la ecuación 3.44, el tiempo de equilibrado de la extracción es proporcional al espesor del revestimiento de la fibra y de la capa límite que lo rodea. Por consiguiente, la sensibilidad de la técnica puede mejorarse aumentando el espesor del recubrimiento (Ouyang *et al.*, 2011). Sin embargo, se producirá un aumento significativo en el tiempo de la extracción. La disminución del espesor de la capa límite acelera el proceso de extracción. La ecuación 3.44 también indica que un analito con un valor de $K_{D(f/s)}$ alto tendrá un tiempo de equilibrio de extracción largo (Ouyang *et al.*, 2011).

$$t_{extracción} \approx t_{95} = 3 \frac{\delta \times K_{D(f/s)} \times (b - a)}{D_s} \quad \text{Ecuación 3.44}$$

En el caso del muestreo por HS-SPME, el tiempo de equilibrio de la extracción depende de la cinética de transporte de masa de los analitos desde la muestra al HS y, finalmente, desde el HS al revestimiento de fibra (Wercinski, 1999; Pawliszyn, 2012). En este sentido, la presencia del HS sobre una muestra acelera la extracción de analitos con altas constantes de la ley de Henry (Pawliszyn, 2012). Esto es debido a que, la velocidad inicial de extracción, y por lo tanto, el tiempo de extracción, es controlada por la difusión de analitos desde la matriz de muestra, y, dado que los analitos volátiles tienen altos coeficientes de difusión en la fase gaseosa, la adición de un HS gaseoso facilita el transporte de los solutos desde la muestra hacia la fase extractante de la fibra (Pawliszyn, 2012). Sin embargo, a temperatura ambiente, sólo los analitos volátiles son transportados a través del espacio de cabeza, mientras que, para los compuestos de baja volatilidad, puede ser necesario el calentamiento de la muestra, aunque se disminuya la magnitud de la constante de distribución $K_{D(f/s)}$ (Pawliszyn, 2012).

Es de destacar que cuando se calienta la muestra no sólo aumenta la constante de la ley de Henry, sino que también se induce la convección en el HS debido a que los gradientes de densidad asociados con los gradientes de temperatura del sistema aumentan las velocidades de transporte de masa (Pawliszyn, 2012). Como la transferencia total de masa hacia la fibra está limitada por las velocidades de transferencia de masa de la muestra hacia el HS, hay que tener en cuenta que los analitos volátiles se extraen más rápido que los semivolátiles porque están en una concentración más alta en el HS, lo que contribuye a velocidades más rápidas de transporte de masa a través del HS (Figura 3.14) (Pawliszyn, 2012).

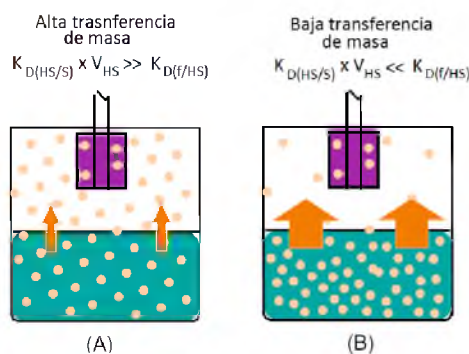


Figura 3.14. Distribución del analito en la microextracción en fase sólida del espacio de cabeza como función de las tasas de transferencia de materia (Pawliszyn, 2012).

Por lo anterior, la temperatura tiene un efecto significativo en la cinética del proceso HS-SPME, lo que puede ser claramente observado en la figura 3.15 (Pawliszyn, 2012).

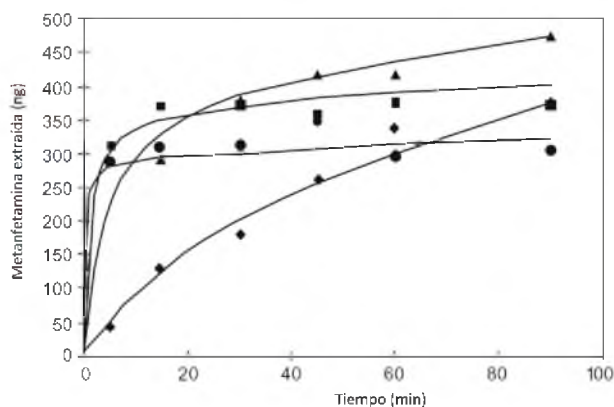


Figura 3.15. Efecto de la temperatura sobre la velocidad de microextracción de metanfetamina. (◆) 22 °C; (▲) 40 °C; (■) 60 °C; y (●) 73 °C (Pawliszyn, 2012).

El equilibrio de extracción se alcanza cuando la concentración de analito es homogénea dentro de cada una de las tres fases y las diferencias de concentración entre dos fases contiguas han alcanzado los valores de su coeficiente de partición (Wercinski, 1999;

Pawliszyn, 2012). Sin embargo, pueden ser muy diferentes para diferentes analitos en muestras distintas (figura 3.16). Por este motivo, deben optimizarse en cada caso los tiempos que tardan diversos sistemas en alcanzar los equilibrios de extracción (Wercinski, 1999; Ouyang *et al.*, 2011; Pawliszyn, 2012).

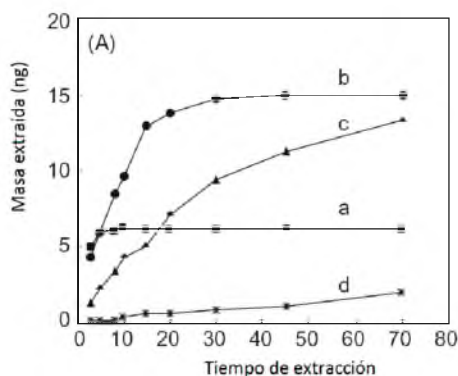


Figura 3.16. Tiempos de extracción de diferentes analitos volátiles: (a) naftaleno; (b) 1,8-etilen-naftaleno; (c) fenantreno; y (d) criseno (Pawliszyn, 2012).

3.2.1.3- Tipos de recubrimientos de las fibras de microextracción en fase sólida

Las ecuaciones 3.34 y 3.39 indican que la eficiencia de la SPME depende del coeficiente de distribución del analito entre la fase de la muestra y la fase extractante. Como se vio anteriormente y como muestra la figura 3.7, la selectividad del sorbente de la fibra por el analito afecta la cantidad de analito extraído, como muestra la figura 3.7. Los revestimientos pueden ser líquidos o sólidos, y existe una diferencia sustancial entre el rendimiento de los diferentes revestimientos líquidos y sólidos (Wercinski, 1999; Lord & Pawliszyn, 2000; Pawliszyn, 2012). En el caso de los recubrimientos líquidos, la extracción es un proceso de absorción, mientras que, en los sólidos, se verifica un proceso de adsorción (Pawliszyn, 1999; Lord & Pawliszyn, 2000; Pawliszyn, 2012).

En los revestimientos líquidos los analitos se disuelven en la fase extractante, por lo que el proceso depende del coeficiente de partición del analito entre el HS y recubrimiento de la fibra. En este proceso, el coeficiente de difusión dentro del recubrimiento líquido permite que las moléculas penetren todo el volumen de la fase extractante en un tiempo razonable si la capa es delgada (Pawliszyn, 2012).

En el caso de los sorbentes sólidos, el revestimiento tiene una estructura cristalina o una similar al vidrio (estructura no cristalina), la cual, si es densa, reduce sustancialmente los coeficientes de difusión dentro del revestimiento (Pawliszyn, 2012). Por lo tanto, en el lapso

de tiempo del experimento, la sorción ocurre solamente en la superficie porosa del recubrimiento. En este proceso, la dependencia entre la concentración de equilibrio del compuesto en el adsorbente y su concentración en el HS se denomina isoterma de adsorción (Pawliszyn, 1999). El término isoterma se utiliza para indicar que se está considerando la sorción a una temperatura constante. Las isotermas de adsorción se pueden representar mediante la ecuación 3.45, donde $C_{adsorbida}$ es la concentración de un compuesto sobre la superficie sólida de la fase extractante, K' es una constante y n es una medida de la no linealidad implicada (Pawliszyn, 1999).

$$C_{adsorbida} = K' \times C_S^n \quad \text{Ecuación 3.45}$$

La descripción matemática de la isoterma de adsorción dada por la ecuación 3.45 es puramente fenomenológica, es decir, no se basa en ningún modelo físico. Sin embargo, se puede usar la teoría de adsorción de Langmuir para describir el proceso (Pawliszyn, 1999). En el modelo de Langmuir, la superficie tiene un número limitado de sitios de adsorción que pueden ser ocupados por el analito. En el modelo se aplican las siguientes suposiciones: (1) todos los sitios son equivalentes; (2) cada sitio puede contener como mucho una molécula del analito; y (3) no hay interacciones entre las moléculas del analito, de modo que la constante de equilibrio es independiente de la cantidad de especies adsorbidas (Pawliszyn, 1999). El supuesto (2) significa que, como máximo, puede formarse sólo una monocapa del analito sobre la superficie de la fase extractante. La adsorción se trata como una reacción en la que una molécula A reacciona con un sitio vacío, S, para producir un complejo de adsorción, A-S (Pawliszyn, 1999):



Cuando sólo un solo compuesto experimenta adsorción, la concentración de equilibrio de los sitios libres de adsorción (S) está representado por la ecuación 3.46, donde S_0 es la concentración total de sitios activos en la superficie sólida y A-S es la concentración de sitios ocupados (Pawliszyn, 1999).

$$[S] = [S_0] - [A-S] \quad \text{Ecuación 3.46}$$

Sustituyendo la ecuación 3.46 en la constante de equilibrio del proceso de adsorción, se obtienen las ecuaciones 3.47 y 3.48 (Pawliszyn, 1999).

$$S_0 = \frac{[A - S]}{K_{A-S} \times [A]} + [A - S] \quad \text{Ecuación 3.47}$$

$$[A - S] = S_0 \times \frac{K_{A-S} \times [A]}{(1 + K_{A-S} \times [A])} \quad \text{Ecuación 3.48}$$

Si la concentración de analito adsorbido en la fibra es C_{fA} y la concentración máxima de sitios activos sobre el revestimiento es $C_{f\text{máx}}$, entonces las concentraciones se pueden representar mediante las ecuaciones 3.49 y 3.50, donde Φ es el área de poro y V_f es el volumen de la fase extractante (Pawliszyn, 1999).

$$C_{fA} = [A - S] \times \frac{\Phi}{V_f} \quad \text{Ecuación 3.49}$$

$$C_{f\text{máx}} = [S_0] \times \frac{\Phi}{V_f} \quad \text{Ecuación 3.50}$$

Si se asume que el sorbente tiene un tamaño de poro uniforme a lo largo de todo su volumen, las concentraciones superficiales pueden ser reemplazadas por las concentraciones multiplicando ambos lados de la ecuación 3.48 por el término Φ/V_f , lo que da como resultado las ecuaciones 3.51 y 3.52 (Pawliszyn, 1999).

$$[A - S] \times \frac{\Phi}{V_f} = S_0 \times \frac{\Phi}{V_f} \times \frac{K_{A-S} \times [A]}{(1 + K_{A-S} \times [A])} \quad \text{Ecuación 3.51}$$

$$C_{fA} = C_{f\text{máx}} \times \frac{K_{A-S} \times [A]}{(1 + K_{A-S} \times [A])} \quad \text{Ecuación 3.52}$$

A partir de la ecuación 3.52 es evidente que la concentración de un analito en la fibra es una función lineal de su concentración en la muestra, excepto cuando el producto ($K_{A-S} \times [A]$) es mucho menor que 1, lo cual puede ocurrir cuando la afinidad de un analito hacia el recubrimiento es bajo, o su concentración en la muestra es muy baja.

En la práctica, es poco probable que haya sólo un analito que se adsorba en la fibra. Entonces, si la proporción del analito con respecto a las interferencias es alta, en tiempos cortos de extracción, la cantidad de analito extraída será elevada. Sin embargo, después de largos tiempos de extracción, los analitos con menor afinidad que las interferencias serán desplazados de la fase extractante, reduciendo la eficiencia de la extracción. Esto se debe a que sólo se dispone de una superficie limitada para la adsorción (Pawliszyn, 2012). Como

consecuencia, en estos casos se produce una competencia, y la cantidad extraída de analitos será función de las concentraciones de los demás componentes de la mezcla, de las afinidades de los analitos y las interferencias por la fase extractante, y de los tiempos de extracción (Pawliszyn, 2012). Esta competencia no ocurre en la extracción con fases extractantes líquidas porque en estas condiciones, las cantidades de extracción varían con el equilibrio de partición que sólo se modifican si las propiedades del revestimiento cambian por acción de los componentes extraídos (Pawliszyn, 2012).

Por todo lo anterior, el análisis cuantitativo mediante SPME con revestimientos líquidos normalmente no se verá afectado por la composición de la matriz debido a que la absorción es un proceso no competitivo. Además, el intervalo lineal de absorción del analito es muy amplio (Pawliszyn, 2012). Por otra parte, siendo la adsorción un proceso competitivo, tanto la composición de la matriz como las condiciones de la microextracción afectarán la cantidad de analito extraída por la fibra. Una forma de superar la limitación fundamental de los revestimientos sólidos es usar tiempos de extracción menores que el tiempo de equilibrado de la extracción, de manera que la cantidad total de analitos acumulada en el revestimiento poroso es inferior al valor de saturación (Pawliszyn, 2012). La figura 3.17 muestra los mecanismos de sorción en fases extractantes líquidas y sólidas.

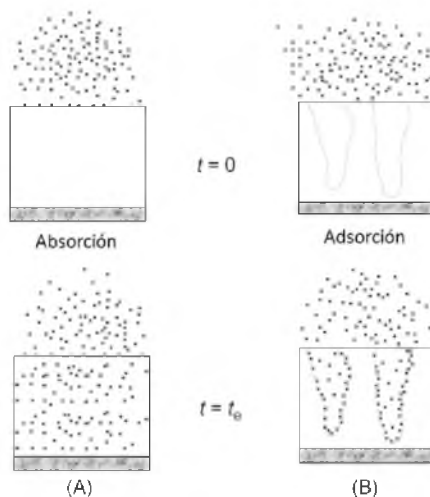


Figura 3.17. Mecanismos de sorción en fibras con recubrimiento líquido (A) y sólido (B) (Pawliszyn, 2012).

3.2.1.4- Desorción de analitos extraídos

Una vez completada la extracción, los analitos que contiene la fibra, se desorben en el puerto de inyección de un cromatógrafo de gases o de líquidos (Pawliszyn, 2012). Para el análisis por

GC, el proceso de desorción implica insertar la fibra en el inyector caliente del GC. A medida que la temperatura de la fibra aumenta, los coeficientes de reparto del analito entre el recubrimiento de la fibra y el gas disminuyen, por lo que disminuye la capacidad de la fibra para retener los analitos (Wercinski, 1999). Además, el flujo constante de gas portador dentro del inyector del GC ayuda a descargar los analitos desde el revestimiento de la fibra y los transfiere a una columna más fría, donde se condensan y concentran cuando se utiliza el sistema *splitless* (Wercinski, 1999). En general, un tiempo de desorción de dos minutos puede ser adecuado para liberar todos los analitos del revestimiento de la fibra (Wercinski, 1999).

3.2.2- Aspectos metodológicos de la microextracción en fase sólida del espacio de cabeza

3.2.2.1- Viales para la muestra

En el procedimiento de análisis de compuestos volátiles en el HS, se puede utilizar esencialmente cualquier pequeño recipiente. En general se utilizan viales de vidrio borosilicato, con volúmenes entre 5 y 22 mL. Cuando se van a realizar métodos cuantitativos se debe determinar el volumen real del vial para establecer la relación de fases, lo cual puede llevarse a cabo llenando con agua destilada un adecuado número de viales, pesándolos, y luego usando el valor promedio para los cálculos. El volumen de los viales se calcula a partir de la densidad del agua a la temperatura del laboratorio ($\delta = 0,9971 \text{ g/mL}$ a 25°C) (Kolb & Ettre, 2006).

La figura 3.1 muestra un vial de HS, el cual está equipado con un *septum* de un material que no ad/absorbe compuestos volátiles, y sellado con un precinto de aluminio (Figura 3.18). El diseño del borde superior del vial debe proporcionar un cierre hermético (Kolb & Ettre, 2006).

El espacio de cabeza del vial está cerrado por un *septum* y una tapa. Los sellos de caucho de butilo no se pueden utilizar porque absorben rápidamente compuestos volátiles no polares y tienen un límite de temperatura superior relativamente bajo (alrededor de 100°C). Por otro lado, los compuestos polares, particularmente los alcoholes, frecuentemente muestran una pequeña pérdida con estos sellos. Los septa de Viton (de caucho fluorado), son los más recomendados debido a algunas de sus propiedades: (a) soportan temperaturas de hasta 220°C

°C; (b) son resistentes a la acción de ácidos, bases y solventes orgánicos; y (c) son inertes a los compuestos volátiles (Kolb & Ettre, 2006).



Figura 3.18. Viales para microextracción en fase sólida del espacio de cabeza y accesorios relacionados: (SV) vial de borosilicato; (S) septum de Viton; y (AC) precinto de aluminio (Kolb & Ettre, 2006).

Los viales se pueden limpiar por lavado con una solución detergente seguida de enjuague con abundante agua destilada y secado en horno a alta temperatura. Una vez limpios se deben conservar dentro de una atmósfera sin contaminantes volátiles y libre de humedad, tal como la que provee un desecador. Esto es importante debido a que se ha observado pérdida de analitos ante la presencia de una capa de agua sobre la superficie del vidrio interior (Kolb & Ettre, 2006).

3.2.2.2- Fibras comerciales de microextracción en fase sólida

Los revestimientos de SPME se pueden clasificar principalmente en categorías según el tipo de recubrimiento, el espesor del revestimiento, el tipo de mecanismo de extracción y la polaridad (Wercinski, 1999; Pawliszyn, 1999; Lord & Pawliszyn, 2000; Pawliszyn, 2012). En la tabla 3.2 se muestra una lista de las fibras comercialmente disponibles (Pawliszyn, 2012). La clasificación de las fibras según los mecanismos de extracción en la figura 3.19 y las estructuras químicas de los polímeros usados como recubrimiento en la figura 3.20.

Tabla 3.2. Tipos de revestimientos de las fibras para SPME comercialmente disponibles (Pawliszyn, 2012).

Tipo de recubrimiento	Espesor del revestimiento	Mecanismo de extracción	Polaridad
PDMS	7 μm	Absorción	No polar
	30 μm		
	100 μm		
PA	85 μm	Absorción	Polar
PEG	60 μm	Absorción	Polar
Carbopack Z-PDMS	15 μm	Adsorción	Bipolar
PDMS-DVB	65 μm	Adsorción	Bipolar
DVB-CAR-PDMS	50 μm /30 μm	Adsorción	Bipolar
CAR-PDMS	75 μm	Adsorción	Bipolar

PDMS: Polidimetilsiloxano; PA: Poliacrilato; PEG: Polietilenglicol (Carbowax); Carbopack Z: adsorbente de carbono; DVB: Divinilbenceno; CAR: Carboxeno (adsorbente de carbono).

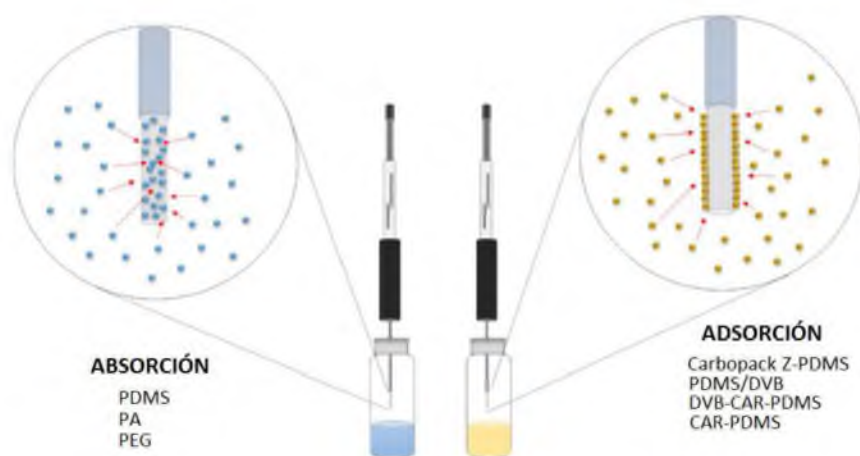


Figura 3.19. Clasificación de las fibras comerciales según el mecanismo de extracción involucrado.³

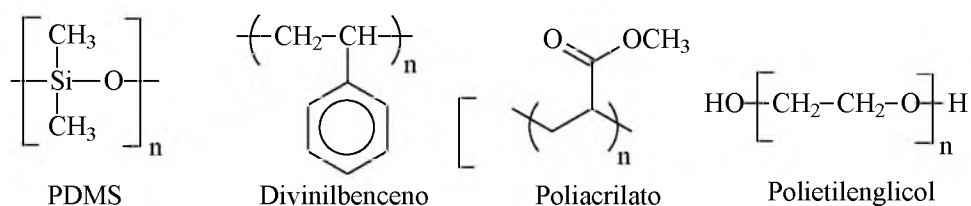


Figura 3.20. Estructuras químicas de los polímeros más comúnmente utilizados como recubrimiento de las fibras para SPME (Pawliszyn 2012).

³ Fuente: <http://eprints.ucm.es/42933/1/T38815.pdf>

3.2.2.2.1- Fases líquidas

(a) *Polidimetilsiloxano*

La fase no polar más común es de polidimetilsiloxano (PDMS), que se utiliza usualmente en la fabricación de columnas de GC. Este polímero puede ser altamente reticulado, es térmicamente estable y un buen material de extracción, aunque no tiene una alta afinidad por los analitos polares (Wercinski, 1999; Pawliszyn, 2012). Es posible fabricar varios espesores de forma reproducible debido a que el PDMS es fácil de manipular, aunque el espesor está limitado a aproximadamente 100 μm debido a que uno más grueso no permitiría la retracción de la aguja sin ser dañada la fibra (Pawliszyn, 2012).

Mediante la adición de enlaces de acoplamiento, el PDMS se reticula de forma covalente consigo mismo para formar un polímero de peso molecular más alto a medida que el revestimiento de la fibra se cura térmicamente (Pawliszyn, 2012). Los revestimientos más gruesos de 30 y 100 μm tienen un límite de temperatura máxima inferior a 300 $^{\circ}\text{C}$ en comparación con el recubrimiento de 7 μm más altamente reticulado con un límite de temperatura máximo de 320 $^{\circ}\text{C}$ (Pawliszyn, 2012). Las figuras 3.20 y 3.21 muestran la estructura química de PDMS.

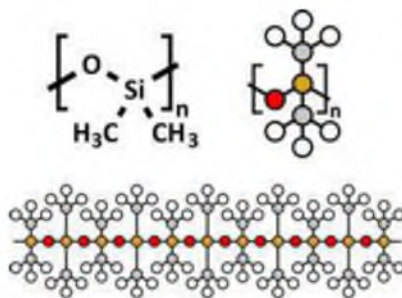


Figura 3.21. Estructura de polidimetilsiloxano. ⁴

(b) *Poliacrilato*

El poliacrilato (PA) es un revestimiento moderadamente polar y es bastante universal para la extracción de una amplia gama de analitos, tanto polares como no polares (Wercinski, 1999; Pawliszyn, 2012). Este polímero es más rígido que el PDMS o el polietilenglicol, por lo que

⁴ Fuente: <http://www.canstockphoto.com/silicone-oil-polydimethylsiloxane-17261421.html>

la migración de analitos dentro y fuera de este revestimiento es ligeramente más lenta. La fase tiene una alta afinidad por compuestos aromáticos y analitos oxigenados (Pawliszyn, 2012).

Los recubrimientos de PA tienen una estabilidad térmica moderada, por lo que el revestimiento se oscurece con el tiempo y el espesor disminuye ligeramente a medida que se utiliza la fibra (Pawliszyn, 2012). Limitar el tiempo de desorción de la fibra a una temperatura por debajo de 280 °C puede minimizar estos problemas. Además, es muy importante usar un gas portador de alta pureza con un buen purificador que elimine las trazas de oxígeno para evitar su oxidación. La buena integridad de los sellos de entrada al puerto de inyección aumentará la vida útil de la fibra por reducir el ingreso de aire (Pawliszyn, 2012). La figura 3.20 muestra la estructura química del PA.

(c) Polietilenglicol

El polietilenglicol (PEG) o Carbowax es el revestimiento más polar disponible en las fibras de SPME producidas comercialmente. Esta fase tiende a ser más selectiva hacia los analitos polares. La fibra de PEG tiene una estabilidad térmica moderada, pudiendo utilizarse a temperaturas de hasta 250 °C (Pawliszyn, 2012). Sin embargo, tiene algunos inconvenientes (Wercinski, 1999): (a) tiende a hincharse o disolverse en agua, lo que aumenta el riesgo de ser retirado de la fibra cuando la fibra se retrae dentro de la aguja exterior; (b) al igual que el poliacrilato, es sensible al oxígeno a temperaturas superiores a 220 °C, por lo que debe usarse un gas portador libre de oxígeno cuando se trabaja a estas temperaturas. La figura 3.20 muestra la estructura química de PEG.

3.2.2.2.2- Fases adsorbentes

Los recubrimientos adsorbentes extraen analitos por atrapamiento físico dentro de los poros de un sólido (Wercinski, 1999; Pawliszyn, 2012). En estas fibras, el material sólido se suspende en un polímero líquido que recubre la fibra, siendo el sólido un polímero poroso de carbono o de sílice (Pawliszyn, 2012). En estos casos, los analitos migran hacia los poros del adsorbente durante el proceso de extracción, y la retención del analito depende de su tamaño y del diámetro de poro. Las interacciones del analito con la superficie del adsorbente pueden ser del tipo π - π , puente de hidrógeno o fuerzas de van der Waals (Pawliszyn, 2012). La capacidad

de un adsorbente para retener analitos depende de la superficie total, y de la cantidad y tamaño de los poros (Pawliszyn, 2012). Si bien la capacidad de extracción de los adsorbentes depende del área superficial total, esto es sólo es una medida parcial ya que, en muchos casos, un adsorbente con un área de superficie menor puede tener una capacidad de extracción mucho más alta que uno con un área superficial mayor (Pawliszyn, 2012). La capacidad de extracción de un adsorbente está determinada también por el tamaño de los analitos, siendo inversamente proporcional al tamaño del analito (Pawliszyn, 2012). En general, un poro puede retener un analito cuyo diámetro es aproximadamente la mitad del diámetro del poro, por lo que, tanto el grado de porosidad como el tamaño promedio del poro son también importantes para determinar la capacidad de extracción de un adsorbente (Pawliszyn, 2012). Los adsorbentes más utilizados son carboxeno y divinilbenceno, aunque, al ser sólidos, deben ser mezclados en una fase líquida como PDMS (Pawliszyn, 1999).

(a) *Carboxeno*

El carboxeno (CAR) tiene varias características favorables que, cuando se mezclan con PDMS, crean una fase bipolar para analitos más pequeños (Wercinski 1999, Pawliszyn 2012). Estas características incluyen tamaño del poro y de la partícula, distribución, volumen y forma del sólido (Wercinski, 1999; Pawliszyn, 2012).

CAR es carbono poroso con una distribución uniforme de los poros. El tamaño de poro es crítico para determinar qué analitos serán extraídos, teniendo en cuenta que, como se dijo anteriormente, para una extracción óptima el diámetro del poro debe ser aproximadamente el doble del tamaño de la molécula que se está extrayendo (Pawliszyn, 2012). El diámetro promedio de los microporos de carboxeno es ligeramente mayor que 10 Å con una distribución de entre 2 y 20 Å, lo cual es ideal para atrapar pequeñas moléculas (Pawliszyn, 2012). Sin embargo, no retiene analitos extremadamente pequeños tales como metano, nitrógeno y oxígeno, aunque el etano se retiene ligeramente (Wercinski, 1999; Pawliszyn, 2012). Además, tiene un alto porcentaje de porosidad (0,78 mL/g), lo que le da más superficie de atrapamiento (Wercinski, 1999). La superficie de CAR está entre 720 y 950 m²/g (Wercinski, 1999).

Es importante destacar que, debido a que el CAR se produce sintéticamente, pueden controlarse cuidadosamente tanto el tamaño de partícula como el volumen y el tamaño de poros. El análisis microscópico de partículas de CAR en fibras de SPME revela un tamaño

promedio de poro de 2 μm , con una distribución de tamaños que va desde 1 a 4 μm (Wercinski, 1999). Estas partículas pequeñas permiten recubrir múltiples capas sobre la fibra, lo que aumenta la capacidad total de la fibra (Pawliszyn, 2012).

Como se dijo anteriormente, los analitos no sólo deben ser adsorbidos dentro del poro, sino que también deben ser desorbidos eficientemente. La forma que toma el poro puede afectar la velocidad de adsorción y desorción (Wercinski, 1999; Pawliszyn, 2012). En este sentido, debido a que en el CAR la mayoría de los poros atraviesan toda la longitud de la partícula, característica conocida como *rendimiento*, los analitos se desorben más rápidamente (Wercinski, 1999). Sin embargo, aquellos poros que no tengan buen rendimiento darán como resultado una desorción extremadamente lenta. Normalmente, una desorción pobre es causada por histéresis, es decir, por la condensación de un analito en el poro (Wercinski, 1999). Adicionalmente, los poros cerrados o los poros con forma de hendidura tienen un grado de histéresis mucho más alto que los poros cónicos abiertos de carboxeno (Pawliszyn, 2012). Las altas temperaturas de desorción ayudan a minimizar los efectos de la histéresis liberando moléculas moderadamente grandes (Wercinski, 1999).

Por todo lo anterior, el CAR tiene suficiente variedad de poros y un área suficiente para extraer y desorber eficientemente moléculas en el rango $\text{C}_2\text{-C}_{12}$. Sin embargo, moléculas mayores que C_{12} son fuertemente retenidas y no son fácilmente desorbidas (Wercinski, 1999). La figura 3.22 muestra una fibra recubierta por CAR-PDMS.

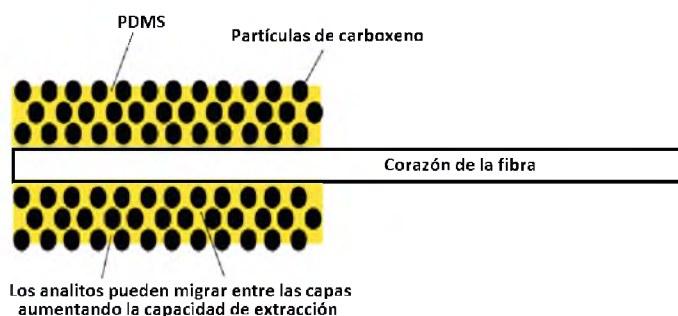


Figura 3.22. Fibra recubierta por CAR-PDMS (Pawliszyn, 2012).

(b) *Divinilbenceno*

El polímero de divinilbenceno (DVB) tiene una distribución porosa más homogénea que el CAR. Su superficie es de aproximadamente 750 m^2/g (Wercinski, 1999; Pawliszyn, 2012), posee microporos bastante grandes, con un diámetro promedio de 17 \AA y un alto grado de

porosidad (1,5 mL/g), por lo que DVB es ideal para extraer analitos C₆-C₁₅ (Wercinski, 1999). En general el polímero de DVB se utiliza principalmente para la extracción de analitos semivolátiles y volátiles de mayor peso molecular (Pawliszyn, 2012).

La combinación de DVB con PDMS proporciona una retención ligeramente mejor de analitos más pequeños, y se ha demostrado que tiene afinidad para algunos analitos polares (Wercinski, 1999). La limitación de las fibras con DVB es que los revestimientos son más frágiles y pueden ser desprendidos de las fibras, por lo que se necesitan precauciones adicionales para protegerlas (Wercinski, 1999; Pawliszyn, 2012).

Es importante destacar que después del proceso de activación, las fibras con DVB son capaces de extraer aminas alifáticas de cadena corta, altamente polares (Pawliszyn, 2012). Este proceso de activación expone más de la superficie del DVB, lo que permite extraer las aminas, siendo la cantidad de las aminas extraídas proporcional al grado de activación (Pawliszyn, 2012). Sin embargo, una activación excesiva puede debilitar la unión del revestimiento con el núcleo de la fibra (Pawliszyn, 2012).

Las fibras con DVB son sensibles al oxígeno a temperaturas elevadas, ya que se oxidan (Pawliszyn, 2012) provocando oscurecimiento y, finalmente, pulverización del recubrimiento. Por ello es recomendable trabajar a temperaturas en el intervalo de 180-240 °C y usar purificadores del gas portador para mantenerlo libre de oxígeno (Pawliszyn, 2012).

(c) Divinilenceno-Carboxeno-Polidimetilsiloxano

Debido a que las fibras de CAR en PDMS tienen dificultad para desorber analitos de peso molecular más alto y que las de DVB en PDMS tienen dificultad para extraer analitos con pesos moleculares bajos, se desarrolló una fibra con ambos adsorbentes ubicados de manera estratificada con el fin de ampliar el rango de pesos moleculares de los analitos extraídos (Pawliszyn, 2012). Inicialmente, los adsorbentes de DVB y CAR se mezclaron en la misma proporción que las fibras que contenían cada adsorbente individual en PDMS. Cuando se evaluó esta fibra, se comportó de forma similar a las fibras revestidas con un revestimiento más delgado de CAR y PDMS, ya que todos los analitos migraron al CAR por ser el adsorbente más fuerte. Aún en proporciones variadas se obtuvieron los mismos resultados (Pawliszyn, 2012).

Mediante la aplicación del principio utilizado en los tubos de desorción térmica y en los sistemas de purga y trampa, los adsorbentes se colocaron en capas de modo que el adsorbente más débil (DVB-PDMS) se encontrara en la capa más externa y el más fuerte (CAR-PDMS) en la capa más interna. De ese modo, los analitos más grandes entran primero en contacto con el adsorbente más débil, y los más pequeños migran a través de ella hacia la capa interna. Así se logró una fibra capaz de extraer analitos de un intervalo más amplio de pesos moleculares, y capaz de detectar niveles de concentración de trazas en mezclas complejas, lo que no se logra con los demás recubrimientos (Pawliszyn, 2012). La figura 3.23 muestra un esquema de una fibra de DVB-CAR-PDMS.

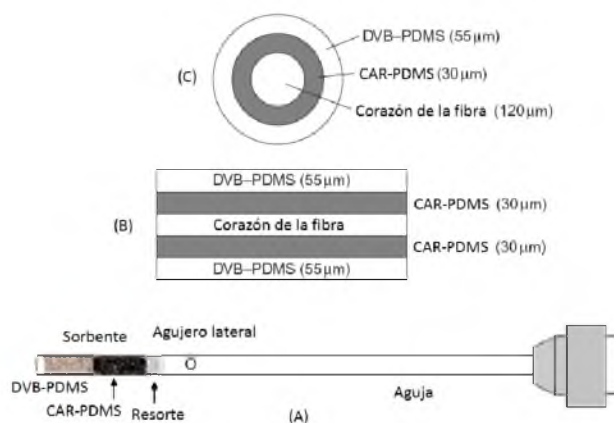


Figura 3.23. Fibra de divinilbenceno-carboxeno-polidimetilsiloxano (DVB-CAR-PDMS): (A) vista de la fibra; (B) vista de un corte lateral; y (C) vista frontal (Pawliszyn, 2012).

La figura 3.24 muestra las propiedades de polaridad y capacidad de retención de las fibras de SPME comercialmente disponibles.

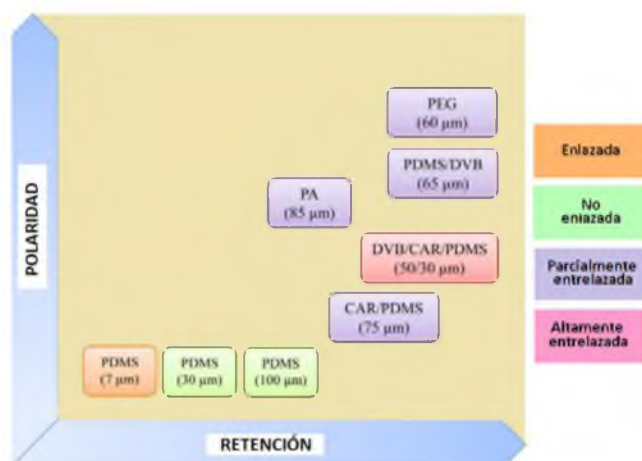


Figura 3.24. Propiedades de las fibras de SPME comercialmente disponibles en cuanto a polaridad y capacidad de retención. PEG: polietilenglicol; PDMS: polidimetilsiloxano; DVB: divinilbenceno; PA: poliacrilato; CAR: carboxeno (Silva *et al.*, 2014).

3.2.2.3- Procedimiento general de análisis

En el procedimiento analítico de HS-SPME se pueden diferenciar tres etapas: en la primera, la muestra que se encuentra dentro del vial herméticamente sellado, es termostatizada a una temperatura determinada, durante un tiempo suficiente para que alcance el equilibrio de partición del analito entre la muestra y el HS (*tiempo de equilibrado del HS*). En la segunda etapa, se introduce la fibra a través del septum del vial donde se encuentra la muestra termostatizada a una determinada temperatura, poniéndose así en contacto con los analitos volátiles presentes en el HS durante un tiempo determinado (*tiempo de extracción o de exposición de la fibra*), de manera que se produce una migración de los analitos desde el HS hacia la fibra hasta que se alcanza el equilibrio. En la tercera etapa, la fibra se retira del vial e inmediatamente se introduce en el puerto de inyección de un cromatógrafo de gases o de líquidos, donde los analitos retenidos por la fibra se desorben. (Wercinski, 1999; Kataoka *et al.*, 2000; Lord & Pawliszyn, 2000; Pawliszyn, 2012; Silva *et al.*, 2014; Merkle *et al.*, 2015). En la figura 3.25 se muestra el procedimiento general de HS-SPME.

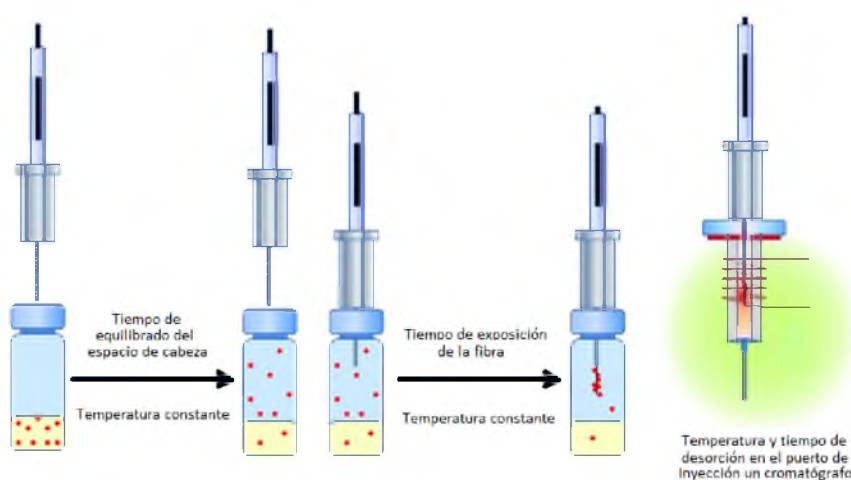


Figura 3.25. Procedimiento general de análisis de compuestos volátiles por microextracción en fase sólida del espacio de cabeza.⁵

3.2.2.4- Optimización del proceso de muestreo

Las variables del proceso de muestreo por HS-SPME deben optimizarse en cada caso, para lograr extraer la cantidad adecuada de analitos volátiles de una muestra determinada, de acuerdo con los requerimientos analíticos. Una optimización apropiada de las variables del

⁵ Fuente: <https://www.hindawi.com/journals/jamc/2014/753237/fig3/>

proceso reducirá el número de experimentos necesarios para lograr una buena reproducibilidad (Kataoka *et al.*, 2000).

En general, la optimización de cada parámetro se debe realizar dejando los demás constantes (Wercinski, 1999; Kataoka *et al.*, 2000; Lord & Pawliszyn, 2000; Pawliszyn, 2012). Numerosos trabajos se publicaron respecto de la optimización de las diferentes variables del proceso de microextracción de compuestos volátiles en diversos tipos de muestras (Kataoka *et al.*, 2000; Lord & Pawliszyn, 2000; Hamm *et al.*, 2003; Mazida *et al.*, 2005; Pellati *et al.*, 2005; Belliardo *et al.*, 2006; Deng *et al.*, 2006; Câmara *et al.*, 2007; Mirhosseini *et al.*, 2007; Balasubramanian & Panigrahi, 2011; Barbera *et al.*, 2013; Ma *et al.*, 2013; Tankiewicz *et al.*, 2013; Silva *et al.*, 2014; Bhourri *et al.*, 2016; Xu *et al.*, 2016).

3.2.2.3.1- Selección del tipo de fibra

Hay cuatro criterios principales que se utilizan para seleccionar el tipo de fibra adecuado para una aplicación en particular (Pawliszyn, 2012; Silva *et al.*, 2014). Estos son: (a) peso molecular y tamaño del analito, (b) polaridad del analito, (c) nivel e intervalo de concentración del analito en la muestra, y (d) complejidad de la muestra.

El peso molecular de un analito, y, por lo tanto, su tamaño, determina la rapidez con que puede moverse dentro y fuera del recubrimiento de la fibra y a través de la muestra. Un analito más pequeño se moverá más rápido, mientras que los analitos más grandes migran más lentamente, por lo que tardan mucho más tiempo en alcanzar el equilibrio (Pawliszyn, 2012). La figura 3.26 muestra un intervalo de pesos moleculares de analitos extraídos en cada tipo de recubrimiento de fibra.

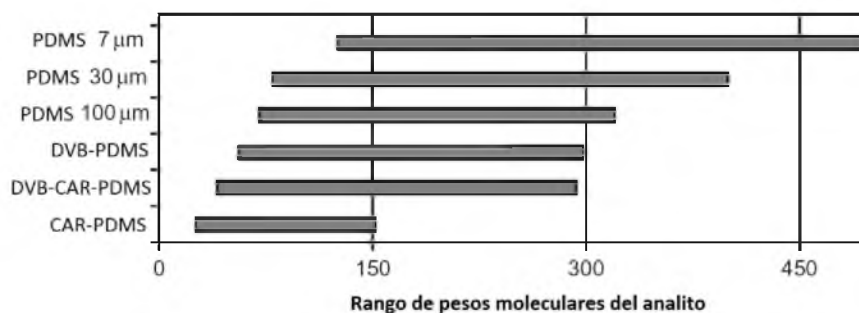


Figura 3.26. Rango de pesos moleculares extraídos con cada tipo de fibra de microextracción en fase sólida (Pawliszyn, 2012).

La afinidad de la fibra por un analito depende de la polaridad del analito y la fibra, por lo que su elección se debe basar en el principio de lo similar extrae lo semejante, esto es, los revestimientos no polares serán los elegidos para la extracción de solutos apolares, mientras que los polares serán los más adecuados para la extracción de solutos polares (Kataoka *et al.*, 2000; Pawliszyn, 2012). En el caso de los compuestos volátiles de bajo peso molecular, las fibras recubiertas con CAR y PDMS son la mejor opción. Una vez que el peso molecular aumenta por encima de 80 uma, el efecto de la polaridad de la fibra se hace más importante para la extracción de analitos polares (Pawliszyn, 2012).

Sólo hay dos revestimientos de fibra polar: las fases con PEG y PA, como se resume en la figura 3.24. Sin embargo, las otras fibras todavía tienen cierta afinidad para los analitos polares, como es el caso de DVB-PDMS. En el caso de analitos apolares se prefieren las fibras con PDMS no polar (Kataoka *et al.*, 2000).

La concentración de analito en la muestra y la complejidad de la matriz de la muestra también juegan un papel importante durante la selección de la fibra. Las fibras que extraen por adsorción tienen una capacidad más limitada en comparación con las fibras absorbentes con un espesor similar debido a que los analitos tienden a competir por los sitios disponibles (Pawliszyn, 2012).

En términos generales, las fibras CAR/PDMS y DVB/CAR/PDMS proporcionan buenas eficiencias de extracción para una amplia gama de analitos con diferentes polaridades y pesos moleculares (Merkle *et al.*, 2015). Por otro lado, la fibra con PDMS tiene la capacidad de soportar temperaturas de hasta 300 °C con una gran estabilidad (Nilsson *et al.*, 1997). Compuestos como disulfuros y trisulfuros se extraen bien con DVB, mientras que compuestos como los alcoholes, aldehídos, cetonas, éteres y ácidos carboxílicos se extraen más eficientemente con fibras que consisten en una combinación de, por ejemplo, un material no polar como PDMS con un material polar como DVB (Merkle *et al.*, 2015).

En la literatura, la optimización de las condiciones SPME se basa ya sea en las áreas de los picos de algunos compuestos presentes en el cromatograma o en la suma de las áreas de los picos de todos los compuestos identificados en la muestra en función del tipo de fibra (Kataoka *et al.*, 2000; Lord & Pawliszyn, 2000; Hamm *et al.*, 2003; Granero *et al.*, 2004; Mazida *et al.*, 2005; Pellati *et al.*, 2005; Belliardo *et al.*, 2006; Deng *et al.*, 2006; Câmara *et al.*, 2007; Mirhosseini *et al.*, 2007; Balasubramanian & Panigrahi, 2011; Barbera *et al.*, 2013; Ma *et al.*, 2013; Tankiewicz *et al.*, 2013; Silva *et al.*, 2014; Bhourri *et al.*, 2016; Xu *et al.*, 2016). La figura 3.27 muestra ejemplos de selección del tipo de recubrimiento para el análisis de volátiles utilizando el área total del cromatograma (A) y el área de cada pico (B).

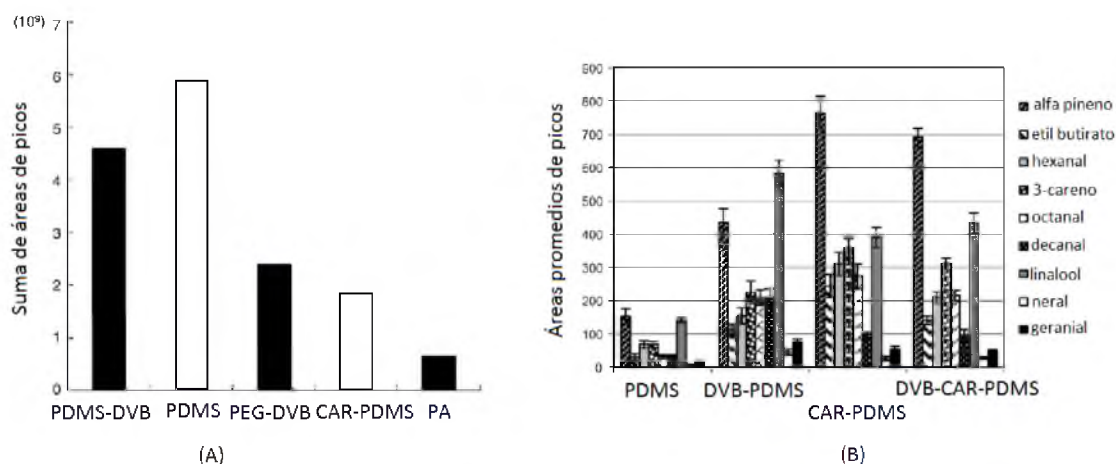


Figura 3.27. Ejemplos de optimización para la selección del tipo de fibra para HS-SPME: (A) Selección de fibras para el análisis de volátiles en rizomas de cúrcuma, donde se evalúa el área total de picos en función del tipo de fibra (Deng *et al* 2006); (B) Selección de fibras para el análisis de volátiles en bebidas, donde se evalúa el área promedio de cada pico en función del tipo de fibra (Mirhosseini *et al.*, 2007).

3.2.2.3.2- Selección de la temperatura de trabajo

Como se dijo anteriormente, un aumento en la temperatura de extracción aumenta la velocidad de extracción, pero puede provocar una disminución en la constante de distribución de la mayoría de los analitos volátiles, lo que disminuye la sensibilidad de la técnica (Wercinski, 1999; Kataoka *et al.*, 2000; Lord & Pawliszyn, 2000; Pawliszyn, 2012). Por lo tanto, se puede obtener un adecuado equilibrio entre la sensibilidad y la tasa de extracción con respecto a la temperatura mediante una optimización cuidadosa.

Tal como con la selección del tipo de recubrimiento, en la optimización de la temperatura de extracción de compuestos volátiles en muestras complejas por HS-SPME, se puede utilizar el área total de picos del cromatograma o el área de cada pico en función de la temperatura (Kataoka *et al.*, 2000; Lord & Pawliszyn, 2000; Hamm *et al.*, 2003; Mazida *et al.*, 2005; Pellati *et al.*, 2005; Belliardo *et al.*, 2006; Deng *et al.*, 2006; Câmara *et al.*, 2007; Mirhosseini *et al.*, 2007; Balasubramanian & Panigrahi, 2011; Barbera *et al.*, 2013; Ma *et al.*, 2013; Tankiewicz *et al.*, 2013; Silva *et al.*, 2014; Bhouri *et al.*, 2016; Xu *et al.*, 2016). La figura 3.28 muestra un ejemplo de la selección de la temperatura de extracción para el análisis de volátiles por HS-SPME utilizando como variables el área total y el área de los picos de distintos componentes de la muestra.

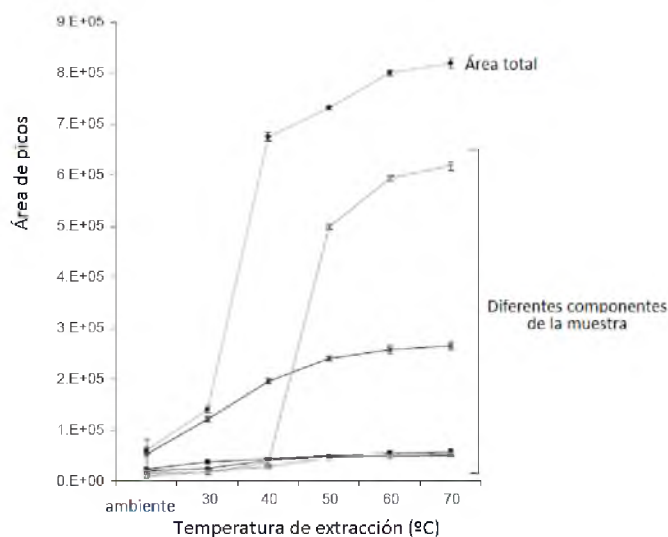


Figura 3.28. Ejemplo de optimización para la selección de la temperatura de extracción de volátiles de *Capsicum annuum* fresco por HS-SPME (Mazida *et al.*, 2005).

3.2.2.3.3- Selección de tiempos de equilibrado del espacio de cabeza y de extracción

Como se dijo anteriormente, los tiempos de equilibrado del HS y de extracción (tiempo de exposición de la fibra en el HS) pueden ser muy diferentes para distintos analitos en muestras diversas (figura 3.16), por lo que deben optimizarse en cada caso, pudiéndose también utilizarse el área total de los picos del cromatograma o el área de cada pico en función del tiempo (Kataoka *et al.*, 2000; Lord & Pawliszyn, 2000; Hamm *et al.*, 2003; Mazida *et al.*, 2005; Pellati *et al.*, 2005; Belliardo *et al.*, 2006; Deng *et al.*, 2006; Câmara *et al.*, 2007; Mirhosseini *et al.*, 2007; Balasubramanian & Panigrahi, 2011; Barbera *et al.*, 2013; Ma *et al.*, 2013; Tankiewicz *et al.*, 2013; Silva *et al.*, 2014; Bhourri *et al.*, 2016; Xu *et al.*, 2016). La figura 3.29 muestra un ejemplo de la optimización del tiempo de extracción para el análisis de volátiles por HS-SPME.

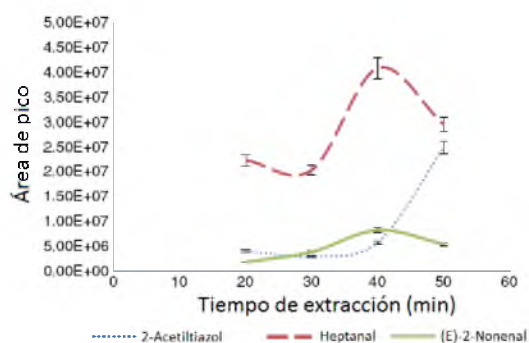


Figura 3.29. Ejemplo de optimización para la selección del tiempo de extracción para de extracción de los componentes del aroma de carne cocida por HS-SPME (Ma *et al.*, 2013).

3.2.3- Aplicaciones de la microextracción en fase sólida del espacio de cabeza

El uso del muestreo por SPME se ha incrementado en los últimos años, como demuestra el crecimiento en el número de publicaciones relacionadas con esta técnica (Figura 3.30). Además, su aplicación se ha extendido al análisis de una gran variedad de matrices (sólidas, líquidas, gaseosas), de muestras de diverso origen (alimentos, medicamentos, muestras biológicas, muestras ambientales, entre otros) y de una amplia gama de analitos (Koziel *et al.*, 1999; Kataoka *et al.*, 2000; Lord & Pawliszyn, 2000; Rocha *et al.*, 2001; Pérez *et al.*, 2002; Hamm *et al.*, 2003; Mazida *et al.*, 2005; Pellati *et al.*, 2005; Belliardo *et al.*, 2006; Deng *et al.*, 2006; Hippelein, 2006; Jun *et al.*, 2006; Câmara *et al.*, 2007; Mirhosseini *et al.*, 2007; De Jager *et al.*, 2008; Wong *et al.*, 2009; Tateo & Bononi, 2010; Balasubramanian & Panigrahi, 2011; Pickl *et al.*, 2011; Prakash *et al.*, 2012; Sheehan *et al.*, 2012; Barbera *et al.*, 2013; Ma *et al.*, 2013; Merib *et al.*, 2013; Tankiewicz *et al.*, 2013; Gao *et al.*, 2014; Gorynski *et al.*, 2014; Maia *et al.*, 2014; Monteiro *et al.*, 2014; Silva *et al.*, 2014; Bhourri *et al.*, 2016; Xu *et al.*, 2016; De Grazia *et al.*, 2017; Farag *et al.*, 2017; Souza-Silva & Pawliszyn, 2017). Por esa razón, las técnicas de SPME ocupan una posición de liderazgo, incluyendo el estudio de la composición de volátiles en plantas medicinales y aromáticas, donde ha asumido una importancia cada vez mayor (Zhu *et al.*, 2013; Merkle *et al.*, 2015).



Figura 3.30. Número de publicaciones científicas relacionadas con microextracción en fase sólida desde 1990 hasta 2015 (Fuente: Editorial Elsevier).⁶

Como se vio en este capítulo, la SPME es una técnica que, en los últimos años, se convirtió en una de las opciones preferidas para el análisis de compuestos volátiles debido a los bajos

⁶ Fuente: <http://eprints.ucm.es/42933/1/T38815.pdf>

límites de detección que pueden obtenerse, su fácil operación, rapidez en el análisis, alta selectividad y por ser una técnica libre de solventes (Balasubramanian & Panigrahi, 2011; Zhu *et al.*, 2013; Merkle *et al.*, 2015). Sin embargo, no deben pasarse por alto las dificultades para utilizar esta metodología analítica cuando se aplica a matrices complejas, ya que las propiedades de la matriz de la muestra son esenciales para la selección de la fibra SPME apropiada y para la optimización de los parámetros de extracción que aseguren una adecuada sensibilidad analítica y resultados reproducibles (Balasubramanian & Panigrahi, 2011).

Capítulo 4

Análisis sensorial de alimentos

-
- 4.1- Generalidades del análisis sensorial.
 - 4.2- Mecanismo de la percepción sensorial.
 - 4.2.1- Las propiedades organolépticas y los sentidos del ser humano.
 - 4.2.1.1- El sentido del gusto.
 - 4.2.1.2- El sentido del olfato.
 - 4.2.1.3- El sentido de la vista.
 - 4.2.1.4- El sentido del tacto.
 - 4.2.1.5- El sentido del oído.
 - 4.2.1.6- Flavor.
 - 4.3- Tipos de pruebas sensoriales.
 - 4.3.1- Pruebas sensoriales analíticas.
 - 4.3.2- Pruebas sensoriales afectivas.
 - 4.3.2.1- Pruebas de preferencia.
 - 4.3.2.2- Pruebas de aceptabilidad
 - 4.4- Jueces.
 - 4.4.1- Jueces analíticos.
 - 4.4.1.1- Jueces expertos.
 - 4.4.1.2- Jueces entrenados.
 - 4.4.1.3- Jueces semientrenados o de laboratorio.
 - 4.4.2- Jueces afectivos o consumidores.
 - 4.5- Presentación de las muestras en las pruebas sensoriales.
 - 4.6- Procesamiento de datos a partir de pruebas de aceptabilidad sensorial.
-

En la antigüedad el hombre percibía los alimentos fundamentalmente por medio de sus sentidos. A través de ellos creaba su relación con base al criterio “me gusta” o “no me gusta”, y de esta manera realizaba no sólo la valoración del sabor; sino también de otras características, las cuales influyen sobre la aceptación o rechazo de un cierto producto alimenticio (Espinoza Manfugás, 2007).

A partir de la evolución de la ciencia y la tecnología de la producción de alimentos, se desarrollaron métodos modernos para la descripción de las interacciones complejas entre el hombre y su percepción de las características de los alimentos, a la vez que se desarrollaron tecnologías que permitieron a la sociedad contar con una amplia gama de productos alimenticios y de métodos de análisis pertinentes (Espinoza Manfugás, 2007). Sin embargo, si bien es cierto que los métodos instrumentales desempeñan un papel muy importante en la evaluación de la calidad de un producto alimenticio, en muchos casos no miden todas sus características en conjunto, sino solamente algunas de ellas y por separado (Anzaldúa-

Morales, 2005; Espinoza Manfugás, 2007). De ahí que la forma más integral de medir la calidad de un alimento, es mediante la evaluación que el hombre realiza de sus propiedades organolépticas a través de la evaluación sensorial (Espinoza Manfugás, 2007).

A continuación, en el presente capítulo se desarrollarán los aspectos teóricos y metodológicos de las herramientas utilizadas para el análisis sensorial de productos alimenticios.

4.1- Generalidades del análisis sensorial

El análisis sensorial es una ciencia multidisciplinaria en la que se emplean jueces humanos que utilizan los sentidos de la vista, olfato, gusto, tacto y oído para medir las propiedades organolépticas de los alimentos y de muchos otros materiales (Elias y Watts 1992, Anzaldúa-Morales 2005, Espinoza Manfugás 2014). Esta metodología de caracterización es aplicable en muchos sectores de la industria de alimentos, tales como el área de desarrollo y mejoramiento de productos, de control de calidad, en estudios sobre el almacenamiento y desarrollo de procesos, entre otros. Sin embargo, si se desea obtener resultados confiables y válidos en los estudios sensoriales, el panel debe ser tratado como un instrumento científico (Elias & Watts, 1992; Espinoza Manfugás, 2007), llevando a cabo los ensayos en condiciones controladas, utilizando diseños experimentales, métodos de prueba y análisis estadísticos apropiados (Holbrook, 2006). Solamente de esta manera, el análisis sensorial podrá producir resultados consistentes, reproducibles y confiables (Holbrook, 2006).

La palabra sensorial deriva del latín *sensus*, que quiere decir sentido. La evaluación sensorial es una disciplina relativamente joven si se la compara con otras disciplinas científicas, como la química o la microbiología. Su nacimiento y evolución metodológica se han producido en la segunda mitad del siglo XX y su consolidación, tanto a nivel académico como industrial, ocurrió recién en la década de 1980 (Moskowitz, 1993; Costell, 2000).

El concepto de calidad sensorial ha ido evolucionando desde que Kramer (1959) la definió como “*conjunto de características que diferencian entre distintas unidades de un producto y que influyen en la aceptación del mismo por el consumidor*”. Algunos autores consideran más importante la primera parte de esta definición y para ellos, la calidad sensorial de un alimento depende principalmente de las características del propio alimento. Otros, ponen el acento en la segunda parte y piensan que la calidad sensorial está ligada principalmente a las preferencias de los consumidores. En el primer caso, la definición de la calidad dependería de los criterios de un grupo de expertos y podría considerarse relativamente constante durante un

determinado periodo de tiempo (Molnar, 1995). Con el segundo planteamiento, la calidad estaría relacionada directamente con las preferencias de los consumidores y por ello, habría que considerarla variable y dependiente del contexto (Cardello, 1995). Si la primera postura puede dar lugar a unos resultados de dudosa validez práctica porque asume que la opinión de los expertos es representativa de la de los potenciales consumidores del producto, tampoco la segunda es totalmente satisfactoria porque para establecer una especificación de calidad no es suficiente, en muchos casos, tener en cuenta exclusivamente los datos de aceptabilidad de un producto (Booth, 1995). Conciliar ambas posturas no es fácil, y quizá un camino sea diferenciar entre los métodos sensoriales que se deben utilizar para definir una especificación de calidad y los métodos aplicables para establecer si un determinado producto las cumple o no (Costell, 2003). Por lo tanto, el concepto de calidad sensorial es difícil de definir debido a que no está ligado exclusivamente a las características o propiedades intrínsecas del alimento, sino que es el resultado de la interacción entre éste y el consumidor (Figura 4.1).

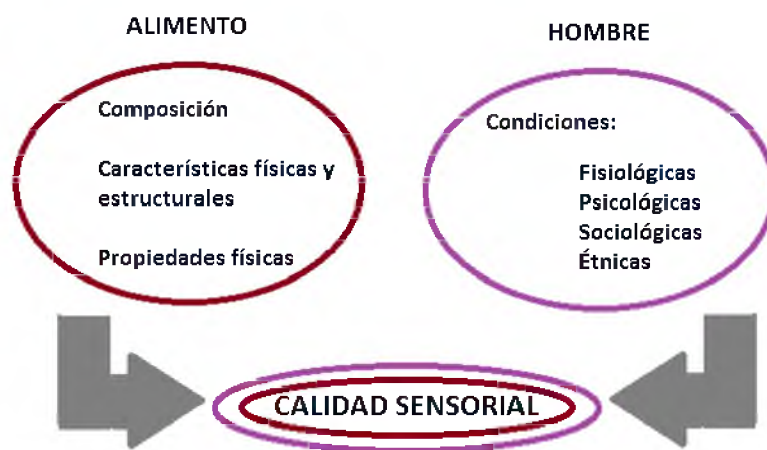


Figura 4.1. Concepto de calidad sensorial como interacción entre las características intrínsecas del alimento y el consumidor (Costell, 2003).

Otro aspecto importante del análisis sensorial es la percepción, definida como la interpretación de la sensación, es decir, la toma de conciencia sensorial, la cual se puede medir únicamente por métodos psicológicos y los estímulos, por métodos físicos o químicos (Sancho & De Castro, 2002). En este sentido, la percepción es la capacidad de la mente de atribuir información sensorial a un objeto externo a medida que la produce (Carpenter *et al.*, 2002). Por lo tanto, la percepción es la base del analizador humano de la calidad sensorial de un producto alimenticio.

4.2- Mecanismo de la percepción sensorial

El diseño o interpretación correcta de los resultados de la evaluación sensorial, requiere del conocimiento de los aspectos psicológicos y fisiológicos de los analizadores humanos, que se definen como un mecanismo nervioso complejo, que empieza en un aparato receptor externo y termina en la corteza cerebral (Espinoza Manfugás, 2007). Los analizadores reciben los estímulos externos, lo transmiten a través de un nervio conductor y lo transforman en sensaciones, las que se interpretan e integran con otras sensaciones y con la experiencia anterior conformando la percepción (Figura 4.2) (Hernández, 2005).

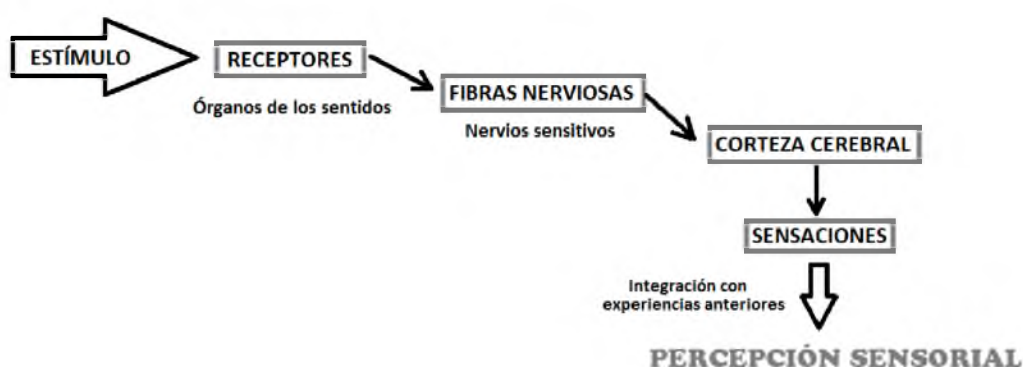


Figura 4.2. Concepto de percepción sensorial como mecanismo de respuesta cerebral al estímulo provocado por las características organolépticas de los alimentos, las que se interpretan e integran con otras sensaciones y con la experiencia anterior conformando la percepción (Espinoza Manfugás, 2007).

4.2.1- Las propiedades organolépticas y los sentidos del ser humano

Las características organolépticas de los alimentos constituyen el conjunto de estímulos que interactúan con los receptores del analizador (órganos de los sentidos) (Anzaldúa-Morales, 2005). El receptor transforma la energía que actúa sobre él, en un proceso nervioso que se transmite a través de los nervios aferentes o centrípetos, hasta los sectores corticales del cerebro, donde se producen las diferentes sensaciones como color, forma, tamaño, aroma, textura y sabor (Espinoza Manfugás, 2007). Los sentidos clásicos son el olfato, gusto, vista, oído, tacto y cenestésico, los que constituyen los medios con los que el ser humano percibe y detecta el mundo que lo rodea. La secuencia de percepción que tiene un consumidor hacia un alimento, es en primer lugar hacia el color, posteriormente el olor, siguiendo la textura percibida por el tacto, luego el sabor y por último el sonido al ser masticado e ingerido (Hernández 2005). Esta perspectiva de cómo influye cada una de las características

organolépticas sobre el análisis sensorial es denominada *sensograma* (Figura 4.3) (Hernández, 2005).

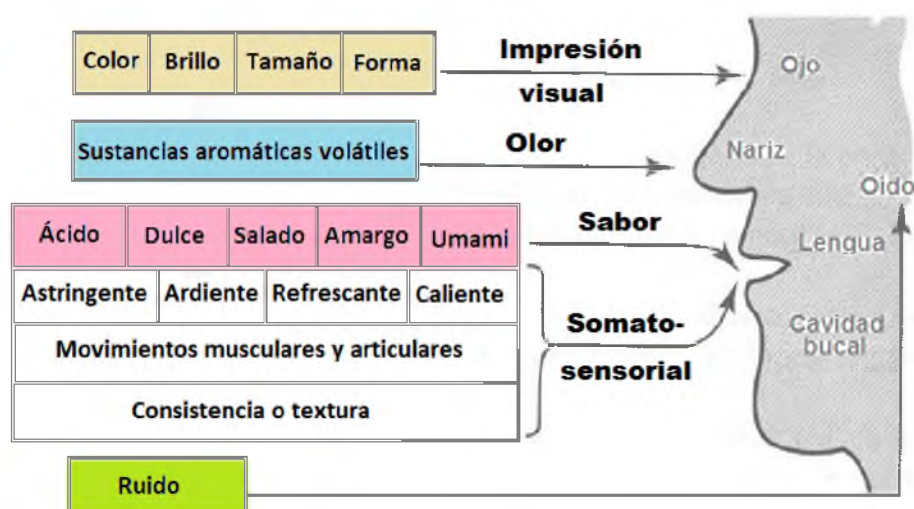


Figura 4.3. Sensograma que destaca las principales impresiones que tiene el consumidor o el evaluador al momento de realizar un análisis sensorial a un alimento (Hernández, 2005).

4.2.1.1- El sentido del gusto

El sentido del gusto posee la función de identificar las diferentes sustancias químicas que se encuentran en los alimentos (Espinoza Manfugás, 2007) y se define como las sensaciones percibidas por los receptores de la boca, denominados botones gustativos, los cuales están concentrados específicamente en la lengua, aunque también se presentan en el velo del paladar, la mucosa de la epiglotis, en la faringe, la laringe y en la garganta (Durán & Costell, 1999; Anzaldúa-Morales, 2005; Hernández, 2005; Espinoza Manfugás, 2007; Guyton & Hall, 2011).

A partir de estudios fisiológicos se considera que existen cinco sensaciones sápidas primarias: dulce, salado, ácido o agrio, amargo y umami, constituyendo éstos los sabores básicos (Figura 4.4) (Durán & Costell, 1999; Anzaldúa-Morales, 2005; Espinoza Manfugás, 2007).

El sabor dulce se percibe con mayor intensidad en la punta de la lengua, zona donde se encuentran las células receptoras que detectan los azúcares, glicoles, aldehídos, cetonas, aminas, esterres, alcoholes o sustancias de naturaleza orgánica que están presentes en los alimentos; el sabor salado y ácido se percibe en los bordes anteriores y posteriores respectivamente, donde los receptores son estimulados por sales ionizadas o por los hidrogeniones de las sustancias ácidas (Anzaldúa-Morales, 2005). El sabor amargo se detecta fundamentalmente en la parte posterior o base de la lengua, donde se encuentran los

receptores de las sustancias orgánicas de cadena larga que contienen nitrógeno en su molécula y alcaloides como la quinina (Hernández, 2005). Por su parte, todas las papilas gustativas de la lengua y otras regiones de la boca pueden detectar el sabor umami, independientemente de su ubicación (Kinnamon, 2009).

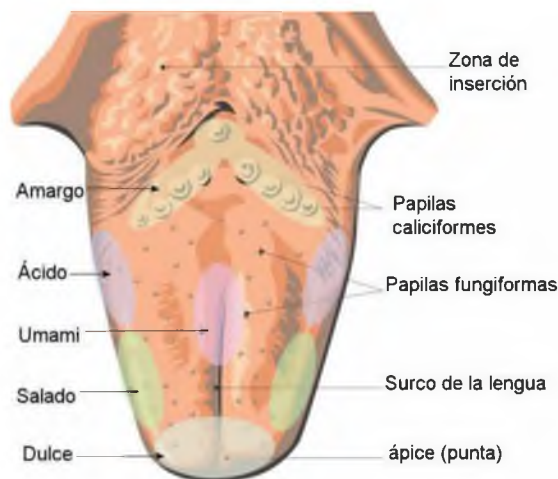


Figura 4.4. Fisiología del gusto y las cinco sensaciones sápidas primarias: dulce, salado, ácido o agrio, amargo y umami.¹

4.2.1.2- El sentido del olfato

El olor de los alimentos se origina por las sustancias volátiles, que, cuando se desprenden de ellos, pasan por las ventanas de la nariz y son percibidos por los receptores olfatorios (Espinoza Manfugás, 2007). El sentido del olfato funciona mediante todo el sistema nasal. En el interior de la nariz y de la zona facial cercana a esta, existen regiones cavernosas cubiertas de una mucosa pituitaria, la cual presenta células y terminales nerviosas que reconocen los diversos olores y transmiten la sensación olfatoria a través del nervio olfativo hasta el cerebro (Figura 4.5) (Anzaldúa-Morales, 2005; Guyton & Hall, 2011). La información transmitida también viaja al sistema límbico, que es la parte primitiva del cerebro que incluye zonas que controlan las emociones, el comportamiento y la memoria (Anzaldúa-Morales, 2005; Espinoza Manfugás, 2007; Guyton & Hall, 2011).

¹ Fuente:

<http://www.efn.uncor.edu/departamentos/divbioeco/anatocom/Biologia/Los%20Sistemas/Nervioso/Periferico/Sentidos/Gusto.htm>

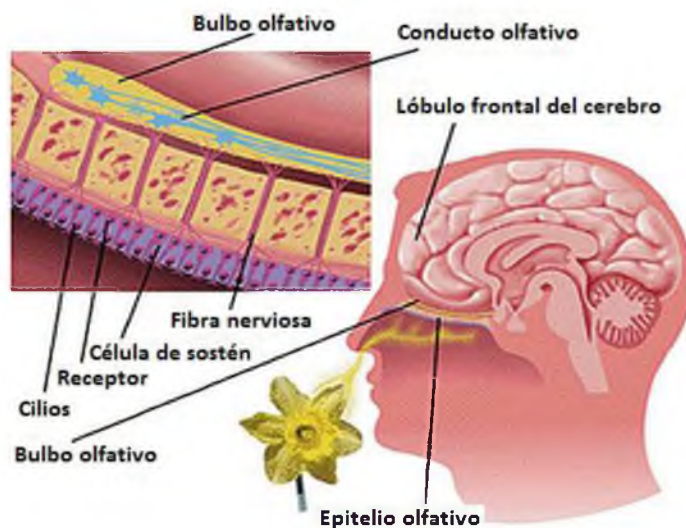


Figura 4.5. Fisiología del olfato. Las moléculas volátiles entran por la nariz y son reconocidas por los sensores olfativos del epitelio olfativo. Éstos envían señales al bulbo olfativo y la señal se transmite al lóbulo frontal del cerebro que es la zona sensorial del olor.²

Es importante diferenciar entre olor y aroma, pues el primero es la percepción de las sustancias volátiles que ingresan por medio de la nariz, mientras que el aroma es la detección que se origina después de haberse puesto el alimento en contacto en la boca, o sea que los compuestos volátiles son percibidos por los mismos sensores olfativos, pero al ingresar por vía retro-nasal (Figura 4.6) (Espinoza Manfugás, 2007).

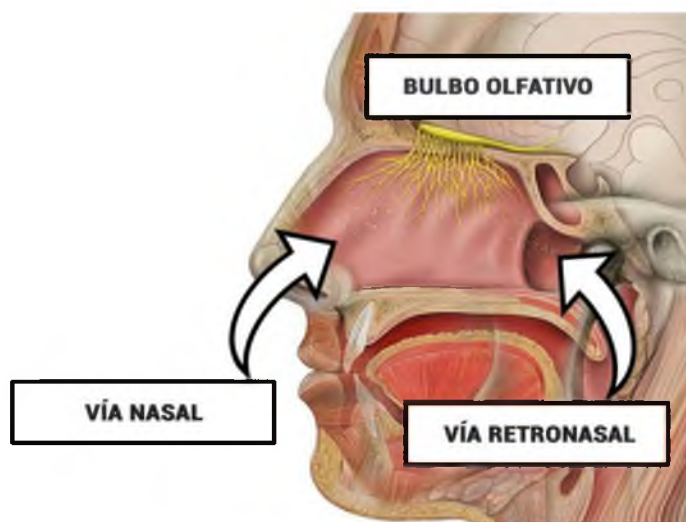


Figura 4.6. Diferencia entre olor y aroma. En el olor los compuestos volátiles ingresan a los sensores olfativos por la vía nasal, mientras que en el aroma, lo hacen luego de que el alimento está en la boca por la vía retronasal.³

² Fuente: <https://demedicina.com/olfato-como-funciona/>

³ Fuente: https://www.vinetur.com/2015022518295/el-75-de-lo-que-consideramos-sabor-es-en-realidad-olor.html?fb_comment_id=778416068914206_795980927157720#f3a593089eb3dd4

4.2.1.3- El sentido de la vista

A través de este sentido se perciben las propiedades sensoriales externas de los productos alimenticios como lo son, principalmente, el color, la apariencia, la forma, la superficie, el tamaño, el brillo, la uniformidad y la consistencia visual o textura. El mecanismo de esta percepción sensorial tiene su origen en el ojo humano, el cual posee tres capas, la esclerótica, la corioidea y la retina, que contiene los elementos nerviosos cuyas fibras se transmiten finalmente al nervio óptico, y de allí a la corteza cerebral (Figura 4.7) (Espinoza Manfugás, 2007; Guyton & Hall, 2011). La percepción del color en los alimentos es de vital importancia, ya que, en la mayoría de las evaluaciones de un producto, el consumidor asocia el sabor de este con un color determinado (Hernández, 2005).

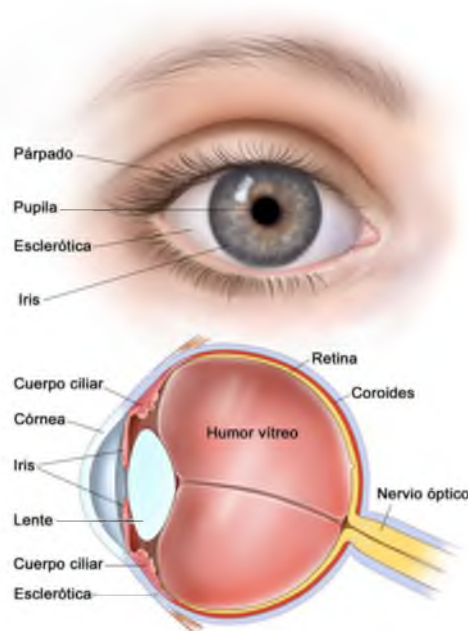


Figura 4.7. Morfología del ojo humano.⁴

4.2.1.4- El sentido del tacto

La sensibilidad sensorial del tacto se percibe en la piel y en la lengua. A través de este sentido se detecta en un alimento la textura, el tamaño, la forma, la viscosidad, la adhesividad, la untuosidad, la dureza, entre otros (Hernández, 2005). Los receptores sensoriales de la piel y la lengua detectan los cambios que se producen en el entorno a través del tacto, la presión y la

⁴ Fuente: <https://www.emaze.com/@AILIIQQL/El-Sentido-De-La-Vista>

temperatura. Cada tipo de receptor está innervado por un tipo específico de fibra nerviosa, que envía la señal a la corteza cerebral (Espinoza Manfugás, 2007; Guyton & Hall, 2011).

4.2.1.5- El sentido del oído

La audición o sensación sonora se produce a partir de una vibración que se propaga a través de un medio fluido (Kinsler *et al.*, 1999). Cuando el pabellón auricular recoge las ondas sonoras, estas se reflejan en sus pliegues y penetran en el conducto auditivo externo hasta que chocan con el tímpano (Guyton & Hall, 2011). Esta membrana empieza a vibrar con una determinada frecuencia e intensidad, luego la serie de pequeños huesos del oído medio amplían este movimiento vibratorio y lo transmiten a la ventana oval, ya en el oído interno (Hernández, 2005; Guyton & Hall, 2011). Aquí, la energía mecánica de las ondas sonoras se transforma en energía eléctrica gracias a que las fibras del nervio auditivo estimulan el órgano de Corti, ubicado en el caracol, y transmiten la sensación auditiva al cerebro (Figura 4.8) (Guyton & Hall, 2011; Mesz *et al.*, 2011).

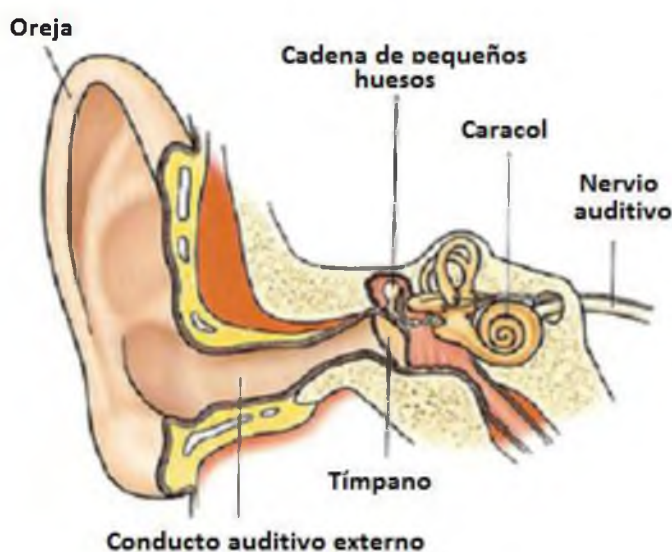


Figura 4.8. Estructura del oído.⁵

Existe correspondencia entre el gusto o sabor de un alimento y el tono de un sonido (Mesz *et al.*, 2011; Crisinel *et al.*, 2012). En este sentido, el ruido o sonido que se produce al masticar o palpar muchos alimentos constituye una información muy apreciada por muchos consumidores que exigen la presencia de esta característica en el alimento que degustan

⁵ Fuente: <https://organosdelosentidos.wordpress.com/sentido-del-oido/>

(Wittig de Penna, 2001). Así, por ejemplo, se exige que algunos alimentos como la manzana sean crujientes; otros burbujeantes, como las gaseosas y el champagne; otros elásticos, como los chicles (Crisinel *et al.*, 2012).

4.2.1.6- Flavor

El flavor es un conjunto complejo de percepción de las propiedades organolépticas de un alimento (Espinoza Manfugás, 2007). Es considerado una combinación de sentidos, aroma, gusto, cenestesia, textura y apariencia (Lozano 2016). Como se describió anteriormente, el aroma es aportado por un grupo de sustancias químicas aroma-activas con una concentración superior a la de la detección humana (umbral de olor). Estos compuestos se liberan desde la matriz del alimento durante la masticación, la actividad enzimática o el aumento de la temperatura. Después de su liberación, estas sustancias químicas llegan a los receptores olfatorios (vía nasal o retronasal) y posteriormente se procesan cognitivamente en el cerebro asociadas con las del gusto que perciben las papilas gustativas, todas las táctiles (textura, consistencia, entre otras), y las sonoras o efectos cenestésicos (como el crunch), para dar la sensación de flavor (Figura 4.9) (Lozano, 2016).

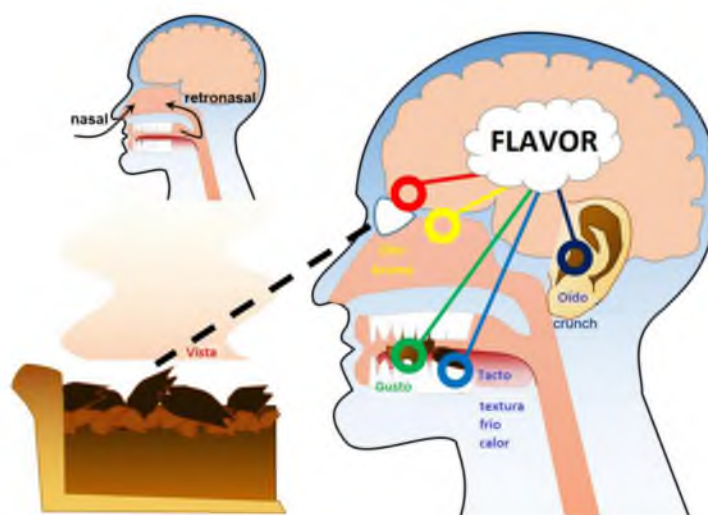


Figura 4.9. Concepto de flavor como conjunto complejo de las propiedades olfativas y gustativas que se perciben durante la degustación, influido por las propiedades táctiles y efectos cenestésicos, esto es, los sonidos relacionados con el alimento (masticación, burbujas, entre otros).⁶

⁶ Fuente: <http://sitn.hms.harvard.edu/flash/2016/brain-tricks-to-make-food-taste-sweeter-how-to-transform-taste-perception-and-why-it-matters/>

4.3- Tipos de pruebas sensoriales

Las pruebas sensoriales pueden estar orientadas al producto o al consumidor (Watts *et al.*, 1992). La información sobre los gustos y aversiones, preferencias y requisitos de aceptabilidad, se obtiene empleando evaluaciones sensoriales orientadas al consumidor, que se llevan a cabo con jueces no entrenados. Por otro lado, la información sobre las características sensoriales específicas de un alimento, requiere pruebas orientadas al producto. Este tipo de información cuantitativa orientada al producto, se obtiene llevando a cabo evaluaciones sensoriales en el laboratorio, con jueces entrenados (Watts *et al.*, 1992).

Existen tres tipos principales de pruebas para realizar un análisis sensorial: las pruebas descriptivas y las discriminativas (orientadas al producto), y las afectivas (orientadas al consumidor) (Anzaldúa-Morales, 2005; Hernández, 2005; Olivas-Gastélum *et al.*, 2009; De Paula *et al.*, 2014). Las pruebas descriptivas y discriminativas también se denominan pruebas analíticas (Espinoza Manfugás, 2007). En este capítulo se describirán con más detalles las afectivas, especialmente las de aceptabilidad, por ser las relacionadas con las llevadas a cabo en el presente trabajo de tesis.

4.3.1- Pruebas sensoriales analíticas

Las pruebas analíticas tienen esa denominación porque se realizan en condiciones controladas de laboratorio, con jueces que han sido seleccionados y entrenados previamente (jueces analíticos) (Espinoza Manfugás, 2007). Dentro de las pruebas analíticas, las descriptivas se basan en la descripción o detalle de las propiedades sensoriales (parte cualitativa) y su medición (parte cuantitativa). En una primera etapa, los jueces son entrenados en un conjunto adjetivos con los que se nombran las sensaciones. En una segunda etapa, se aprende a medir la magnitud o la intensidad de cada propiedad del alimento (Anzaldúa-Morales, 2005; Hernández, 2005).

Por otro lado, las pruebas discriminativas se emplean para determinar si existen diferencias entre dos o más productos, tomando como referencia una muestra control o un producto típico (Anzaldúa-Morales, 2005; Hernández, 2005).

4.3.2- *Pruebas sensoriales afectivas*

Las pruebas afectivas, también llamadas hedónicas (del griego *hedond* que significa placer), se utilizan para evaluar si el producto agrada o no. Se realizan con personas no seleccionadas ni entrenadas, las que constituyen los denominados jueces afectivos (Anzaldúa-Morales, 2005). El número de jueces que se recomienda emplear debe ser mayor de 80, generalmente entre 100 y 150, aunque mientras mayor cantidad se emplee, se logrará una mejor representatividad de la población (Hough *et al.*, 2006; Espinoza Manfugás, 2007). Pueden utilizarse de 25 a 30 jueces sólo si el resultado es a nivel de laboratorio (Anzaldúa-Morales, 2005; Espinoza Manfugás, 2007). Los jueces se escogen atendiendo a que sean consumidores reales o potenciales del producto que se evalúa, pudiendo tener en cuenta situaciones económicas, demográficas, entre otros aspectos (Espinoza Manfugás, 2007). Se emplean en condiciones similares a las que normalmente se utilizan al consumir el producto, de ahí que puedan llevarse a cabo en supermercados, escuelas, plazas, etc. Los resultados que de las mismas se obtienen, permitirán conocer la aceptación, rechazo, preferencia o nivel de agrado de uno o varios productos (Anzaldúa-Morales, 2005; Hernández, 2005; Espinoza Manfugás, 2007).

Las pruebas afectivas se clasifican en pruebas de preferencia y de aceptabilidad (Anzaldúa-Morales, 2005; Hernández, 2005; Espinoza Manfugás, 2007).

4.3.2.1- Pruebas de preferencia

En las pruebas de preferencia, se le presenta al panelista dos muestras codificadas para que determine cual prefiere. Para este tipo de pruebas se requiere alrededor de cincuenta panelistas, aunque no hay un criterio único ni consenso al respecto (Hough *et al.*, 2006; Espinoza Manfugás, 2007).

4.3.2.2- Pruebas de aceptabilidad

Las pruebas de aceptabilidad tienen como objetivo conocer, de acuerdo a un criterio sensorial, si la muestra que se presenta es aceptada o no por los consumidores (Espinoza Manfugás, 2007). Consisten en solicitarles a los panelistas que informen sobre el grado de satisfacción

que tienen respecto de un producto. Los resultados son presentados en una escala, que recibe el nombre de *escala hedónica* (Anzaldúa-Morales, 2005; Hernández, 2005). Las escalas hedónicas son instrumentos de medición de las sensaciones, placenteras o desagradables, producidas por un alimento al degustador (Peryam & Pilgrim, 1957), las cuales pueden ser verbales-numéricas o gráficas (Anzaldúa-Morales, 2005; Hernández, 2005; Espinoza Manfugás, 2007). En las verbales o numéricas (Figura 4.10a), se les solicita a los jueces que realicen una descripción verbal de la sensación que les provoca la muestra, la que a su vez se relaciona con números de una escala. Deben incluir un número impar de puntos, y contener el punto central: “ni me gusta ni me disgusta”. Generalmente, la más usada es la que contiene 9 puntos (Anzaldúa-Morales, 2005; Hernández, 2005; Espinoza Manfugás, 2007). Por otra parte, las escalas gráficas (Figura 4.10b) se usan cuando hay inconvenientes para describir los puntos de la escala o ante limitaciones de los jueces para entender las diferencias entre las expresiones nombradas en la escala, como es el caso de los niños (Anzaldúa-Morales, 2005; Hernández, 2005; Espinoza Manfugás, 2007).



Figura 4.10. Ejemplos de escalas hedónicas (Hernández, 2005). (a) Escala hedónica verbal-numérica, en el ejemplo, desde 1- *Me disgusta muchísimo comprarlo*, hasta 9- *Me gustaría muchísimo comprarlo*. (b) Escala hedónica gráfica.

4.4- Jueces

Las condiciones para el desarrollo y aplicación de las diferentes pruebas sensoriales, son los agentes de medición, esto es, los jueces humanos (Hernández, 2005). Existen dos tipos de jueces de acuerdo al tipo de prueba sensorial, los analíticos y los consumidores o afectivos (Espinoza Manfugás, 2007). Los analíticos son empleados en el control de calidad para el desarrollo de nuevos productos o para cuando se realizan cambios en las formulaciones, mientras que los afectivos son empleados para determinar la reacción del consumidor hacia un producto alimenticio determinado (Espinoza Manfugás, 2007).

4.4.1- *Jueces analíticos*

Los jueces analíticos pueden ser expertos, entrenados o semientrenados (Anzaldúa-Morales, 2005).

4.4.1.1- Jueces expertos

Un juez experto es una persona con gran experiencia en probar un determinado tipo de alimento, el cual posee una gran sensibilidad particularmente desarrollada para percibir las diferencias entre muestras y para evaluar las características del alimento (Anzaldúa-Morales, 2005; Hough *et al.*, 2006; Lawless & Heymann, 2010). Debido a su habilidad y experiencia, en las pruebas que efectúa sólo es necesario contar con su criterio (Hough *et al.*, 2006). Su entrenamiento es muy largo y costoso, por lo que sólo intervienen en la evaluación de productos caros, como por ejemplo el té (Sancho & De Castro, 2002). Estos jueces están revisando constantemente sus habilidades y existen muy pocos en todo el mundo, por lo cual deben abstenerse de hábitos que alteren su capacidad de percepción (Ackerman, 1990; Hough *et al.*, 2006).

4.4.1.2- Jueces entrenados

Un juez entrenado es una persona con bastante habilidad para la detección de alguna propiedad sensorial, que ha recibido enseñanza teórica y práctica sobre la evaluación sensorial, sabe lo que debe medir exactamente y realiza pruebas sensoriales con cierta periodicidad (Anzaldúa-Morales, 2005; Hough *et al.*, 2006). El número requerido es de al menos siete y como máximo quince (Anzaldúa-Morales, 2005; Hough *et al.*, 2006). Se emplean para pruebas descriptivas y discriminativas complejas. Al igual que los jueces expertos, deben abstenerse de hábitos que alteren su capacidad de percepción (Ackerman, 1990; Hough *et al.*, 2006; Lawless & Heymann, 2010).

4.4.1.3- Jueces semientrenados o de laboratorio

Los jueces semientrenados o de laboratorio son personas con un entrenamiento teórico similar al de los jueces entrenados, que realizan pruebas sensoriales con frecuencia y poseen suficiente habilidad, pero que generalmente sólo intervienen en pruebas discriminativas sencillas, las cuales no requieren una definición muy precisa de términos o escalas (Anzaldúa-Morales, 2005). Las pruebas con este tipo de jueces requieren un mínimo de 10 y un máximo de 20 o 25 jueces (Anzaldúa-Morales, 2005; Hough *et al.*, 2006).

4.4.2- *Jueces afectivos o consumidores*

Los jueces afectivos o consumidores son personas que no tienen que ser seleccionados ni adiestrados (Hough *et al.*, 2006; Espinoza Manfugás, 2007), y no realizan evaluaciones sensoriales periódicas (Anzaldúa-Morales, 2005). Son elegidos al azar y sólo se emplean en pruebas afectivas (Espinoza Manfugás, 2007; Hough *et al.*, 2006). Es importante que sean consumidores habituales del producto a valorar o, en el caso de un producto nuevo, que sean consumidores potenciales de dicho producto (Anzaldúa-Morales, 2005).

Como se describió en el apartado correspondiente a las pruebas afectivas, el número de participantes en cada prueba debe ser grande para minimizar la variación propia de la subjetividad de las respuestas y sólo aparezcan las diferencias más importantes del producto sujeto al estudio (Hough *et al.*, 2006; Espinoza Manfugás, 2007). Como se dijo anteriormente, el número mínimo de jueces a emplear debería ser 80, aunque a medida que se aumente este valor el error tiende a disminuir (Hough *et al.*, 2006; Espinoza Manfugás, 2007).

Debido a que los juicios que se emiten pueden estar influenciados por diversos factores propios del individuo, es posible que haya una variación grande entre ellos, por lo que es importante normalizar ciertas condiciones para lograr resultados más objetivos, tales como una explicación detallada del procedimiento de la prueba y de la importancia de los criterios que se emitan, el conocimiento de las características socioculturales y económicas del grupo de jueces, la presentación adecuada de las muestras, entre otras (Anzaldúa-Morales, 2005; Hough *et al.*, 2006; Espinoza Manfugás, 2007).

4.5- Presentación de las muestras en las pruebas sensoriales

Es necesario estandarizar los métodos de presentación de las muestras y es importante que cada panelista reciba una porción representativa de la muestra bajo prueba (Watts *et al.*, 1992). Las muestras deben tener tamaño uniforme cuando son sólidas, mientras que los productos fluidos deberán mezclarse mientras se están tomando las muestras, para obtener porciones de consistencia uniforme (Watts *et al.*, 1992).

Hay algunos alimentos que se deben servir con otro que funciona como vehículo o portador (Watts *et al.*, 1992). Este suele ser el caso de las especias aromáticas, donde se suelen emplear galletas o panes como vehículo. Sin embargo, el uso de vehículos puede presentar problemas, dado que los alimentos empleados como vehículo tienen sabor y textura característicos, que podrían interferir con la evaluación del alimento principal (Anzaldúa-Morales, 2005). En el caso de utilizar vehículos, es importante que se mantengan constantes sus características organolépticas, de modo que las diferencias sean debidas únicamente al producto alimenticio que se desea evaluar (Watts *et al.*, 1992).

Las muestras son presentadas en recipientes idénticos, codificados con números aleatorios de tres o cuatro dígitos, recibiendo cada muestra un número diferente (Watts *et al.*, 1992). Todas las muestras se presentan simultáneamente a cada juez, en un orden preferentemente aleatorio (Watts *et al.*, 1992). En las pruebas afectivas está permitido saborear las muestras más de una vez (Watts *et al.*, 1992; Anzaldúa-Morales, 2005).

A los jueces se les ofrece a menudo agua a temperatura ambiente para que puedan enjuagarse la boca antes y entre las muestras; el agua de enjuague podrá ser ingerida o expulsada (Watts *et al.*, 1992). Si el agua a temperatura ambiente no bastara para eliminar los sabores de la boca entre las degustaciones, se puede recurrir a agua caliente, agua con limón, galletas de soda sin sal, pan blanco o tajadas de manzana (Watts *et al.*, 1992). Si los productos que se están analizando tienen sabores fuertes, podría resultar necesario prolongar el tiempo entre la evaluación de cada muestra o limitar a dos o tres el número de muestras presentadas en cada sesión (Anzaldúa-Morales, 2005).

4.6- Procesamiento de datos a partir de pruebas de aceptabilidad sensorial

Los datos de las pruebas sensoriales pueden presentarse en forma de frecuencias, ordenamiento por rangos o datos numéricos cuantitativos (Watts *et al.*, 1992; Hernández, 2005; Espinoza Manfugás, 2007). La forma de los datos depende del tipo de escala de medición utilizada para la prueba sensorial (Hough *et al.*, 2006). Para el análisis estadístico de los datos, se emplean métodos apropiados para los datos de frecuencia, de ordenamiento o cuantitativos. Los datos de las escalas nominales y ordinales se analizan empleando análisis estadísticos no paramétricos, mientras que los datos de las escalas de intervalo y racionales, se analizan empleando pruebas estadísticas paramétricas (Watts *et al.*, 1992; Hernández, 2005; Espinoza Manfugás, 2007; Næs *et al.*, 2010). Los métodos no paramétricos permiten un grado de discriminación menor que los métodos paramétricos, pero no requieren que los datos tengan una distribución normal e independiente, como ocurre con las pruebas paramétricas (Næs *et al.*, 2010). Por otro lado, los métodos paramétricos requieren escalas con intervalos o categorías constantes, tanto psicológicamente como en magnitud (Næs *et al.*, 2010).

Para evaluar si hay diferencias significativas entre las muestras evaluadas se utiliza el análisis de la varianza (ANOVA) paramétrica o no paramétrica (Næs *et al.*, 2010). En el caso de que se haya confirmado la presencia de diferencias estadísticas mediante ANOVA, se utilizan pruebas de comparación múltiple de medias para identificar las muestras que difieren entre sí (Watts *et al.*, 1992; Nelder, 1994; Balzarini *et al.*, 2008). De las pruebas utilizadas en este sentido, la prueba de Tukey es bastante conservadora para encontrar diferencias entre los datos sensoriales, por esa razón es frecuentemente utilizada (Næs *et al.*, 2010), aunque por su carácter conservador puede no encontrar diferencias cuando éstas en realidad existan (Watts *et al.*, 1992).

Las técnicas de análisis multivariado pueden ser utilizadas cuando se investigan relaciones entre diferentes mediciones o pruebas, o cuando se evalúan conjuntamente datos sensoriales y de otro tipo, como, por ejemplo, físico-químicos (Næs *et al.*, 2010). En estos casos es necesaria una reducción de la información a un tamaño razonable, ya que la mayoría de los datos estarán interactuando y superponiéndose, por lo que siempre están fuertemente intercorrelacionadas (Villarreal *et al.*, 2003; Ibañez *et al.*, 2006; Balzarini *et al.*, 2008; Lawless & Heymann, 2010). Los métodos frecuentemente utilizados son el Análisis de Componentes Principales (PCA), el Análisis de Conglomerados (CA) y el Análisis de Correlación (Næs *et al.*, 2010). Las técnicas de análisis multivariado se han aplicado en numerosos estudios sensoriales solos (Indurain *et al.*, 2001; Padrón Mercado & Barreto, 2011;

Rojas *et al.*, 2012; Linares Luján *et al.*, 2015), o en combinación con ensayos físico-químicos, para una amplia variedad de alimentos diferentes (González *et al.*, 2007; Duflos *et al.*, 2010; Cirlini *et al.*, 2011; Cuevas-Glory *et al.*, 2012; D'Agostino *et al.*, 2014; Cheng *et al.*, 2016).

Como se vio en este capítulo, el análisis sensorial comprende un conjunto de pruebas diferentes para evaluar la calidad organoléptica de un producto alimenticio, las cuales son aplicables de acuerdo al objetivo del estudio en particular. Los datos se procesan mediante diversas herramientas estadísticas que permiten no sólo obtener conclusiones de los estudios sensoriales en sí mismos, sino también de la combinación de ellos con resultados físico-químicos.

2º PARTE:

MATERIALES Y MÉTODOS

Capítulo 5

Materiales y metodologías utilizados

-
- 5.1- Optimización de la técnica de HS-SPME.
 - 5.1.1- Muestras.
 - 5.1.2- Variables de optimización del muestreo por HS-SPME y análisis estadísticos.
 - 5.1.3- Sistemas cromatográficos.
 - 5.1.3.1- Cromatógrafo Gas-FID.
 - 5.1.3.2- Cromatógrafo Gas-Masa.
 - 5.2- Estudios de caracterización de CVV.
 - 5.2.1- Muestras.
 - 5.2.2- Obtención y análisis de los aceites esenciales.
 - 5.2.3- Estudio de la composición de CVV por HS-SPME.
 - 5.2.4- Micropropagación de plantas de *C. odorum* y medios de cultivo.
 - 5.2.5- Estudio de estabilidad de semillas de *C. sativum*.
 - 5.2.6- Estudio de la composición de volátiles en semillas de coriandro producida en años diferentes.
 - 5.2.7- Análisis estadísticos.
 - 5.3- Estudios de evaluación sensorial de muestras de orégano.
 - 5.3.1- Muestras.
 - 5.3.2- Metodología para el análisis sensorial de orégano criollo y chileno II.
 - 5.3.3- Metodología para el análisis sensorial de muestras comerciales de orégano.
 - 5.3.4- Análisis estadísticos.
-

En el presente capítulo se describen las muestras y metodologías utilizadas tanto para los procesos de optimización de las técnicas de HS-SPME, como para los procesos de análisis de CVV por HS-SPME e HD. Además, se describen, cuando corresponde, los procedimientos de análisis sensorial utilizados, así como las herramientas estadísticas aplicadas. En todos los casos, el orden se corresponde con el de presentación de los resultados en los capítulos subsiguientes.

5.1- Optimización de la técnica de HS-SPME

5.1.1- *Muestras*

El proceso de optimización de la metodología analítica basada en la Microextracción en Fase Sólida del Espacio de Cabeza (HS-SPME) se aplicó para las especies que se muestran en la

tabla 5.1. En ella se indica la procedencia y, cuando corresponde, el número de registro de herbario. Las muestras fueron depositadas en el Herbario Marcelino Sayago de la Universidad Católica de Córdoba.

La optimización se llevó a cabo empleando alícuotas de $(100,0 \pm 0,1)$ mg de las muestras, pesadas en balanza analítica Denver AA 200. Las muestras fueron las partes aéreas de las especies de la tabla 5.1, previamente picadas en molinillo marca Ultracomb, las cuales fueron colocadas en viales de vidrio de 20 cm³ de HS cerrados herméticamente con septa de Vitón (Supelco de Sigma-Aldrich) y precintos de aluminio. Posteriormente, los viales sellados conteniendo las muestras fueron introducidos en baño de agua termostatzado (precisión $\pm 0,2$ °C) marca PolyScience modelo 8005 para conducir los ensayos bajo condiciones de temperatura controlada. La introducción de las fibras en el HS de las muestras se llevó a cabo con un portafibra manual (Holder) para SPME (Supelco de Sigma-Aldrich).

Tabla 5.1. Especies vegetales sobre las que se optimizaron las condiciones analíticas para HS-SPME.

Espece	Familia	Procedencia	Nº Registro en herbario
<i>Tagetes minuta</i>	Asteraceae	Sierras Grandes, Córdoba, Argentina (Camino de las Altas Cumbres).	UCCOR 336b
<i>Lantana camara</i>	Verbenaceae	Villa Belgrano, Córdoba, Argentina.	UCCOR 382
<i>Coriandrum sativum</i>	Apiaceae	Cañada de Luque, Córdoba, Argentina. Semillas provistas por productor agropecuario.	UCCOR 422 ¹
<i>Clinopodium odorum</i>	Lamiaceae	Sierras Grandes, Córdoba, Argentina (Camino de las Altas Cumbres).	UCCOR 401
<i>Origanum</i> sp.	Lamiaceae	Muestras comerciales colectadas desde distintos puntos de venta de la Ciudad de Córdoba, todas con número de certificado de inscripción en el Registro Nacional de Producto Alimenticio (RNPA).	-

¹ Para su registro en herbario las semillas fueron previamente germinadas.

5.1.2- Variables de optimización del muestreo por HS-SPME y análisis estadísticos

El proceso de optimización se llevó a cabo según lo descripto en el Capítulo 3. Se evaluaron cinco fases extractantes diferentes: Polidimetilsiloxano (PDMS) de 100 µm; Polidimetilsiloxano-Divinilbenceno (PDMS-DVB) de 65 µm; Carboxeno-Polidimetilsiloxano (CAR-PDMS) de 85 µm, Divinilbenceno-Carboxeno-Polidimetilsiloxano (DVB-CAR-PDMS) de 50/30 µm y Poliacrilato (PA) de 85 µm (Supelco de Sigma-Aldrich, Argentina). Antes de ser utilizadas, las fibras fueron acondicionadas dentro del inyector del GC a 225 °C,

durante 8 horas según instrucciones del fabricante. Una vez que las fibras fueron activadas, se conservaron en desecadores hasta su uso.

Se estudió el efecto de las variables tipo de fibra, temperatura, tiempo de equilibrio del HS y tiempo de exposición de la fibra sobre el proceso de microextracción, modificando una de ellas mientras las demás se mantuvieron constantes. Para evaluar el efecto de cada variable se utilizó la sumatoria de las áreas de los picos obtenidos en el cromatograma y, adicionalmente, también se usaron las áreas de los picos de los compuestos mayoritarios. Se analizaron diferencias significativas mediante un análisis de varianza (ANOVA) paramétrica, con test posterior de Tukey a un nivel de significancia del 5 % ($\alpha = 0,05$). El procesamiento estadístico de los datos se realizó utilizando el software Infostat (versión profesional) desarrollado en la Facultad de Ciencias Agropecuarias, UNC.

5.1.3- *Sistemas cromatográficos*

Una vez absorbidos/adsorbidos los compuestos volátiles por las fibras, éstas fueron introducidas en el inyector del cromatógrafo para su desorción durante 5 minutos. Numerosos estudios demostraron que tiempos de desorción entre 30 s y 5 min son suficientes para una desorción completa (Cao *et al.*, 2006; Guo *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2007; Ma *et al.*, 2013).

5.1.3.1- Cromatógrafo Gas-FID

Se utilizó un cromatógrafo de gases Shimadzu GC14B, equipado con un detector de ionización de llama, un puerto de inyección manual que funciona en modo sin división (*splitless*) y una columna capilar ZB-5 (30 x 0,25 mm x 0,25 μ m). El gas portador fue N₂ 99,99% y presión de la cabeza de 5 psi. La composición porcentual se estableció normalizando el área de cada pico del cromatograma con respecto a la superficie total. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado y el coeficiente de variación fue inferior al 5%.

5.1.3.2- Cromatógrafo Gas-Masa

El equipo utilizado fue un Cromatógrafo de gases Hewlett Packard HP 5890 Serie II adosado a un detector de Masas HP 5970, equipado con un puerto de inyección manual utilizado en

modo *splitless* y una columna capilar HP-5 (30 m x 0,25 mm ID x 0,25 μ m). El gas portador fue He 99,99 % y presión de la cabeza de 5 psi. El MS operó a 70 eV y los espectros se registraron en el rango de *m/z* 25-550 una en el modo de adquisición “*scan-full*”. La temperatura de la interfase en todos los casos fue 230 °C. El sistema de procesamiento de datos usado fue un HP-MS *ChemStation* que incluye una base de datos (biblioteca) Wiley 275. Los componentes volátiles se identificaron mediante la comparación de sus espectros de masa con datos de la biblioteca (match \geq 90) y por la determinación de los respectivos índices de retención Kovat's (KI), (estándar de alcanos normales proporcionado por Sigma-Aldrich). Los índices de retención fueron comparados con los reportados en las bases de datos NIST y Pherobase.

Las condiciones de trabajo de los cromatógrafos de gases para cada familia de plantas se muestran en la tabla 5.2.

Tabla 5.2. Condiciones de trabajo de los cromatógrafos de gases utilizadas en los análisis.

Especies	Condiciones de operación
<i>Tagetes</i> sp.	Temperatura del inyector: 225 °C. Horno: temperatura inicial: 40 °C (5 min), temperatura final: 200 °C (5 min), velocidad de calentamiento: 5 °C / min.
<i>Lantana</i> sp.	Temperatura del inyector: 225 °C. Horno: temperatura inicial: 40 °C, velocidad de calentamiento 1: 10 °C/min hasta 130 °C (5 min), velocidad de calentamiento 2: 1 °C/min hasta 140 °C (10 min); velocidad de calentamiento 3: 1,5 °C/min hasta 155 °C.
<i>Coriandrum</i> sp.	Temperatura del inyector: 225 °C. Horno: temperatura inicial: 40 °C, temperatura final: 130 °C (5 min), velocidad de calentamiento: 2 °C/min.
<i>Clinopodium</i> sp.	Temperatura del inyector: 225 °C. Horno: temperatura inicial: 40 °C, velocidad de calentamiento 1: 2 °C/min hasta 90 °C, velocidad de calentamiento 2: 10 °C/min hasta 130 °C; velocidad de calentamiento 3: 5 °C/min hasta 200 °C.
<i>Origanum</i> sp.	Temperatura del inyector: 225 °C. Horno: temperatura inicial: 40 °C (5 min), temperatura final: 200 °C (5 min), velocidad de calentamiento: 5 °C/min.

5.2- Determinación de compuestos volátiles vegetales

5.2.1- Muestras

La caracterización de CVV se realizó para las especies que se muestran en la tabla 5.3. En ella se indica la procedencia y, cuando corresponde, el número de registro de herbario. En el caso

de *L. camara* se estudiaron cuatro especímenes distintos que se diferenciaron por el color de sus flores. Las semillas de *C. sativum* fueron provistas por el Ing. Agr. Adrián J. Robert.

Tabla 5.3. Especies vegetales estudiadas.

Especie	Familia	Procedencia	Nº Registro en herbario
<i>Tagetes argentina</i> Cabrera ^a	Asteraceae	Sierras Grandes, Córdoba, Argentina (Camino de las Altas Cumbres).	UCCOR 336d ^e
<i>Tagetes filifolia</i> Lag. ^a	Asteraceae	Sierras Grandes, Córdoba, Argentina (Camino de las Altas Cumbres).	UCCOR 399b ^e
<i>Tagetes minuta</i> L. ^a	Asteraceae	Sierras Grandes, Córdoba, Argentina (Camino de las Altas Cumbres).	UCCOR 336b ^e
<i>Lantana balansae</i> ^a	Verbenaceae	Minas de Cuchi Yaco, Dpto. Pocho, provincia de Córdoba.	CANTERO 6093 (CORD) ^d
<i>Lantana camara</i> (flor rosa y amarillo) ^a	Verbenaceae	Ciudad de Córdoba, Argentina.	UCCOR 382 ^e
<i>Lantana camara</i> (flor naranja y amarillo)	Verbenaceae	Ciudad de Córdoba, Argentina.	UCCOR 381 ^e
<i>Lantana camara</i> (flor amarilla) ^a	Verbenaceae	Ciudad de Córdoba, Argentina.	UCCOR 389 ^e
<i>Lantana camara</i> (flor blanca) ^a	Verbenaceae	Ciudad de Córdoba, Argentina.	UCCOR 442 ^e
<i>Lantana grisebachii</i> ^a	Verbenaceae	Valle Hermoso, Dpto. Punilla, provincia de Córdoba.	CANTERO 5737 (CORD) ^d
<i>Coriandrum sativum</i> ^b	Apiaceae	Cañada de Luque, Córdoba, Argentina. Semillas provistas por productor agropecuario.	UCCOR 422 ^{e, e}
<i>Clinopodium gilliesii</i> (Benth.) Kuntze ^a	Lamiaceae	Sierras Grandes, Córdoba, Argentina (Camino de las Altas Cumbres).	UCCOR 402 ^e
<i>Clinopodium odorum</i> (Griseb) Harley ^a	Lamiaceae	Sierras Grandes, Córdoba, Argentina (Camino de las Altas Cumbres).	UCCOR 401 ^e
<i>Origanum</i> sp. ^f	Lamiaceae	Muestras comerciales colectadas desde distintos puntos de venta de la Ciudad de Córdoba, todas con número de certificado de inscripción en el Registro Nacional de Producto Alimenticio (RNPA).	-
<i>Origanum</i> sp. ^f	Lamiaceae	Dos variedades cultivadas en el Valle de Traslasierra por productores de la Cooperativa AROMET, híbridos que denominaron “Orégano criollo” y “Orégano chileno II”.	-
<i>Origanum x majoricum</i> Cambessedes ^a	Lamiaceae	Campo experimental de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la UNC, camino a Chacra de la Merced, Córdoba, Argentina.	UCCOR 417 ^e
Orégano compacto (nombre científico aún en discusión) ^a	Lamiaceae	Campo experimental de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la UNC, camino a Chacra de la Merced, Córdoba, Argentina.	UCCOR 418 ^e

^a Partes aéreas. ^b Semillas. ^c Registro en herbario Marcelino Sayago de la Universidad Católica de Córdoba. ^d Registro en herbario del Museo Botánico Córdoba. ^e Para su registro en herbario las semillas fueron previamente germinadas. ^f Hojas.

5.2.2- *Obtención y análisis de los aceites esenciales*

Los aceites esenciales se obtuvieron a partir de 350 - 500 g de las partes aéreas de plantas, mediante hidrodestilación durante 3-4 horas. La fase orgánica del destilado se separó de la acuosa. Adicionalmente, la fase acuosa fue extraída con tres porciones de 20 mL de cloroformo y se secó sobre MgSO₄ anhidro, el cual luego se separó por filtración. El solvente fue evaporado en un rotavapor.

Alícuotas de los AE diluidas en hexano se inyectaron por triplicado en el GC, procediendo en cada caso según se describe en el apartado 5.1.3.

5.2.3- *Estudio de la composición de volátiles por HS-SPME*

En todos los análisis por HS-SPME se llevó a cabo tal como se describe en los apartados 5.1.1 y 5.1.3, utilizando las condiciones optimizadas para cada caso.

5.2.4- *Micropropagación de plantas de C. odorum y medios de cultivo*

El cultivo *in vitro* permite el crecimiento y desarrollo de material vegetal en recipientes que lo separan del ambiente exterior y lo mantienen en condiciones controladas y asépticas. Entre las diversas técnicas de cultivo *in vitro*, la micropropagación consiste en la producción clonal de vegetales a partir de ápices o explantos nodales de una planta madre (Díaz *et al.*, 2012). La gran producción de nuevas plantas se ve favorecida gracias al rápido crecimiento del material vegetal *in vitro* y a la proliferación de tallos durante los subcultivos (George & Davies, 2008).

Un programa de micropropagación comprende las siguientes etapas (Figura 5.1):

Etapas 0: Selección y acondicionamiento de la planta madre.

Etapas 1: Tratamientos de asepsia y establecimiento del cultivo.

Etapas 2: Desarrollo y multiplicación de los brotes.

Etapas 3: Enraizamiento o acondicionamiento de los brotes para su aclimatación a condiciones *ex vitro*.

Etapas 4: Aclimatación a condiciones *ex vitro*.

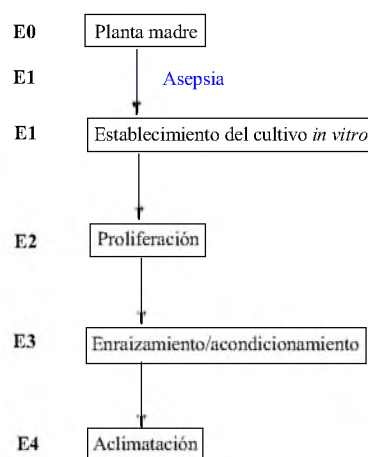


Figura 5.1. Esquema de un programa de micropropagación¹.

Actualmente se cuenta con numerosas técnicas de cultivos vegetales *in vitro*. Los medios nutritivos para el cultivo de células y tejidos vegetales son, en general, menos complejos que los de cultivos microbianos, y son formulados en forma más o menos empírica. Si bien se desarrollan periódicamente nuevas fórmulas comerciales, no existe hasta el presente un diseño racional que tenga en cuenta la composición centesimal de la célula vegetal, y el conjunto de condiciones que controlan el crecimiento y la diferenciación (Krikorian, 1991). No obstante, normalmente se puede utilizar un medio sencillo y complementarlo con diferentes componentes y reguladores de crecimiento para llegar empíricamente a la fórmula que le brinde al tejido las mejores condiciones para su crecimiento y producción (Krikorian, 1991).

Por este motivo, se han descrito un gran número de medios nutritivos para el cultivo de vegetales *in vitro* (Murashige & Skoog, 1962; Gamborg *et al.*, 1968; Schenk & Hildebrandt, 1972; Lloyd & McCown, 1980). Estos medios de cultivo constan de sales minerales, vitaminas, aminoácidos, azúcares y reguladores de crecimiento (Tabla 5.4). La composición mineral se define en forma precisa en cada uno de los medios y está dada tanto por los macroelementos (N, P, K, S, Mg y Ca) como por los microelementos (B, Mn, Zn, Cu, Ni, Co, Mo, Al, I y Fe), los cuales deben estar en una concentración tal que permita el adecuado crecimiento celular (Díaz *et al.*, 2012). Normalmente es imprescindible una fuente de carbono, generalmente la sacarosa, debido a la escasa actividad fotosintética de los tejidos *in vitro* (Krikorian, 1991). Además, el medio puede ser enriquecido con aminoácidos, vitaminas y reguladores del crecimiento (Díaz *et al.*, 2012).

¹ Fuente:

http://ocw.uniovi.es/pluginfile.php/2621/mod_resource/content/1/practicas/Cuaderno_Pract_Biotec_11_OCW.pdf

En este estudio, las plantas *in vitro* fueron obtenidas por germinación de semillas y cultivadas en los medios: Murashige & Skoog (1962) (MS); Schenk & Hildebrandt (1972) (SH); Lloyd & McCown (1980) (WP); Gamborg *et al.* (1968) (B₅); con y sin el agregado de reguladores de crecimiento (PGRs): 6-Benzilaminopurina (BAP) y 2-naftaleno en ácido acético (NAA). La tabla 5.4 muestra la composición de los medios de cultivo MS, SH, WP y B₅, y la tabla 5.5 muestra las composiciones en función del agregado de reguladores de crecimiento. Las plantas fueron micropropagadas por el equipo de investigación dirigido por la Dra. Marta E. Goleniowski, en CEPROCOR, Ministerio de Ciencia y Tecnología de la Provincia de Córdoba.

Tabla 5.4. Composición química de los diferentes medios de crecimiento.

Componente	Medios de cultivo			
	MS ¹	SH ¹	WP ²	B ₅ ¹
	Conc, mg/L	Conc, mg/L	Conc, mg/L	Conc, mg/L
NH ₄ NO ₃	1650	-	400,0	-
KNO ₃	1900	2500	-	2500
CaCl ₂ . 2H ₂ O	440	200	107	150
Ca(NO ₃) ₂ . 4 H ₂ O	-	-	72,5	-
MgSO ₄ . 7 H ₂ O	370	400	370	250
KH ₂ PO ₄	170	-	170	-
(NH ₄) ₂ SO ₄	-	-	-	134
NH ₄ H ₂ PO ₄	-	300	-	-
NaH ₂ PO ₄ . H ₂ O	-	-	-	150
KI	0,83	1,0	-	0,75
K ₂ SO ₄	-	-	990	-
H ₃ BO ₃	6,2	5,0	6,2	3,0
MnSO ₄ . 4 H ₂ O	22,3	-	-	-
MnSO ₄ . H ₂ O	-	10,0	22,3	10,0
ZnSO ₄ . 7 H ₂ O	8,6	1,0	8,6	2,0
Na ₂ MoO ₄ . 2 H ₂ O	0,25	0,1	0,25	0,25
CuSO ₄ . 5 H ₂ O	0,025	0,2	0,25	0,025
CoCl ₂ . 6 H ₂ O	0,025	0,1	-	0,025
Na ₂ EDTA	37,3	20	34,0	37,3
FeSO ₄ . 7 H ₂ O	27,8	15	27,9	27,8
Sacarosa (g)	30	30	-	20
Ácido nicotínico	-	-	0,5	-
Glicina	-	-	2,0	-
Clorhidrato de piroxidina	-	-	0,5	-
Clorhidrato de Tiamina	-	-	1,0	-
pH	5,7	5,8	No indicado	5,5

¹ Fuente: Villalobos y Thorpe 1991, Roca y Mroginski 1991.

² Fuente: <http://www.caissonlabs.com/formpdf.php?product=846>

Tabla 5.5. Características de los medios de crecimiento *in vitro* usados en este estudio.

Medio de cultivo	PGRs (μM) BAP /NAA
MS _{0 1/2}	0.00/0.00
MS _{1/2} plus PGRs	0.40/2.69
SH ₀	0.00/0.00
SH plus PGRs	0.04/0.05
WP ₀	0.00/0.00
WP-plus PGRs	0.04/2.69
B5 _{0 1/2}	0.00/0.00
B5 _{1/2} plus PGRs	0.04/0.50

5.2.5- Estudio de estabilidad de semillas de *C. sativum*

Semillas pulverizadas en molinillo marca Ultracomb se conservaron en frascos herméticamente cerrados a temperatura ambiente, para estudiar el cambio de la composición de CVV durante el almacenamiento. Por otro lado, el estudio del efecto del almacenamiento sobre la composición de CVV de semillas enteras de coriandro se llevó a cabo conservando las semillas en silobolsa a temperatura ambiente durante un año. En ambos casos se utilizó la técnica de HS-SPME optimizada.

5.2.6- Estudio de la composición de volátiles en semillas de coriandro producida en años diferentes

Se estudió el efecto del año de producción sobre la composición de CVV en las semillas de coriandro producidas en los años 2010, 2011 y 2012, todas provistas por el mismo productor agropecuario. El campo estaba ubicado en la zona de Cañada de Luque, Departamento Totoral, de la Provincia de Córdoba, Argentina (Figura 5.2), a una altitud de 239 msnm, latitud 30° 44'16'' S y longitud 63° 43'29'' O. La actividad más importante de la zona es la agricultura, siendo los cultivos principales la soja, el maíz, la avena y el sorgo.²

Los datos de fechas de siembra, cosecha y rendimientos de los cultivos se muestran en la tabla 5.6, los cuales fueron provistos por el Ing. Agr. Adrián J. Robert. Los datos meteorológicos de

² Fuente: <http://www.cañadadeluque.gob.ar/comunidad/>

la época de desarrollo de los cultivos fueron consultados en los registros de las estaciones meteorológicas de la Provincia de Córdoba³.

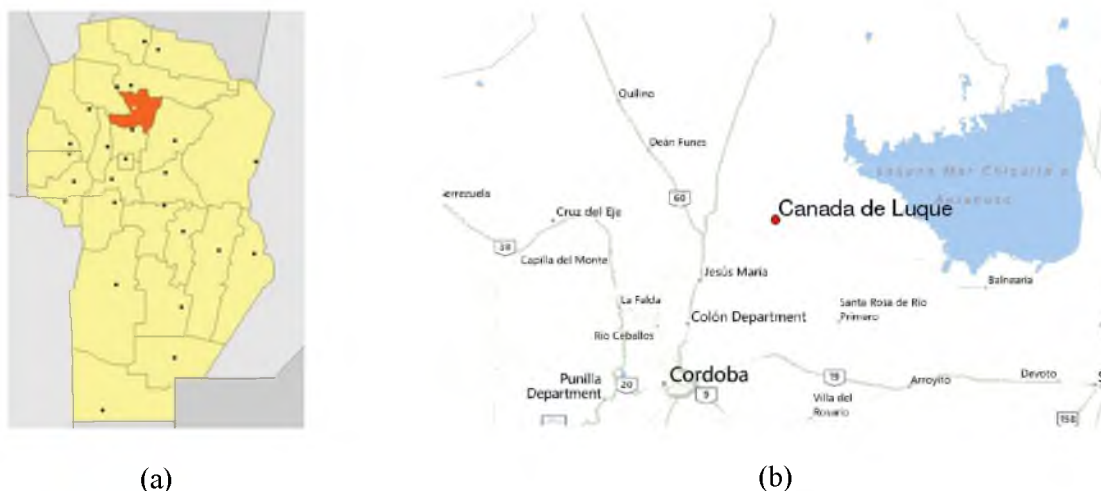


Figura 5.2. Ubicación de la zona geográfica del campo de cultivo de coriandro, en el Departamento Totoral de la Provincia de Córdoba, Argentina. (a) Ubicación del Departamento Totoral en la Provincia de Córdoba⁴. (b) Ubicación de Cañada de Luque⁵.

La cantidad de energía térmica que un organismo acumula durante un período de tiempo se expresa a menudo como *suma térmica* o *grados de crecimiento diario* (GDD), variable que es utilizada para relacionar el crecimiento, desarrollo y madurez de la planta con la temperatura del medioambiente (Parthasarathi *et al.*, 2013). Este índice ha sido aplicado en numerosos sistemas de producción de hortalizas para predecir la fecha de cosecha y el momento de siembras sucesivas (Qadir *et al.*, 2007; Hoyos García *et al.*, 2012). Aunque la GDD acumulada para las diferentes etapas de desarrollo es relativamente constante e independiente de la fecha de siembra, cada híbrido, variedad o cultivar de la especie, puede tener valores específicos para este parámetro (Zheljaskov *et al.*, 2008; Hoyos García *et al.*, 2012).

En este estudio la suma térmica (GDD) se calculó usando la ecuación 5.1, donde TM es la temperatura máxima (en °C) y Tm es la temperatura mínima (en °C) (Zheljaskov *et al.*, 2008), considerando los días desde la siembra ($i=1$) hasta la cosecha (n) de los lotes.

$$GDD = \sum_{i=1}^n \left[\frac{(TM + Tm)}{2} - 5^{\circ}C \right] \quad \text{Ecuación 5.1}$$

³ Fuente: <https://www.tutiempo.net/clima/ws-873440.html>

⁴ Fuente: <http://donorioneprimaria.blogspot.com.ar/2008/10/totoral.html>

⁵ Fuente: <http://micordobaargentina.blogspot.com.ar/2014/07/canada-de-luque.html>

Tabla 5.6. Fechas de siembra, cosecha de los lotes de coriandro. Cañada de Luque, Córdoba, años 2010, 2011 y 2012.⁶

Año	Fecha de siembra	Fecha de cosecha
2010	7 de junio	3 de diciembre
2011	30 de junio	10 de diciembre
2012	30 de junio	10 de diciembre

5.2.7- *Análisis estadísticos*

Con los resultados de la composición de CVV se calcularon medias y desvíos estándares. Además se les aplicó una prueba de normalidad (Shapiro-Wilks modificado) y de homogeneidad de la varianza. En aquellos casos donde se cumplieron los supuestos estadísticos, se analizaron diferencias significativas mediante un análisis de varianza (ANOVA) paramétrica, con test posterior de Tukey a un nivel de significancia del 5 % ($\alpha = 0,05$). En los casos donde los supuestos estadísticos no se cumplieron, se analizaron diferencias significativas mediante un análisis de varianza no paramétrica (Kruskal-Wallis) con test posterior de Dunn, para un nivel de significancia del 5% ($\alpha = 0,05$).

A partir de los resultados encontrados en los perfiles de CVV de algunas de las especies estudiadas, se realizaron, además, análisis estadísticos de correlación de Pearson para un nivel de significancia del 5 % ($\alpha=0,05$), y análisis multivariados a través del Análisis de Componentes Principales (PCA) sobre la matriz de correlación de compuestos volátiles por muestra, y a través del Análisis de Conglomerados (CA) jerárquico con el método de encadenamiento promedio (average linkage) y distancia Euclídea. El objetivo de estos análisis fue observar los agrupamientos de diferentes especies del mismo género o de diferentes especies y/o muestras. En todos los casos el procesamiento estadístico de los datos se realizó utilizando el software Infostat (versión profesional) desarrollado en la Facultad de Ciencias Agropecuarias, UNC.

⁶ Datos provistos por el Ing. Agr. Adrián J. Robert.

5.3- Estudios de evaluación sensorial de muestras de orégano

5.3.1- *Muestras*

Se realizó un estudio de aceptabilidad sensorial sobre nueve marcas comerciales, las cuales fueron identificadas con una letra desde la A hasta la I, asignándole un número aleatorio de cuatro dígitos (tabla 5.7) para evitar sesgo por la identificación por parte de los jueces participantes.

Se analizaron también por separado y en mezcla 1:1, las variedades cultivadas en el Valle de Traslasierra provistas por la Cooperativa AROMET, “Orégano criollo” y “Orégano chileno II”. A cada una de las variedades y a la mezcla se les asignó también un número aleatorio de tres dígitos (tabla 5.7).

Tabla 5.7. Números aleatorios asignados a las muestras de orégano analizadas.

Muestra Evaluada	Número Aleatorio
Marca comercial A	1288
Marca comercial B	3524
Marca comercial C	2549
Marca comercial D	8831
Marca comercial E	5452
Marca comercial F	7561
Marca comercial G	3221
Marca comercial H	6150
Marca comercial I	4578
Orégano criollo	805
Orégano chileno II	766
Mezcla 1:1 orégano criollo y chileno II	748

La prueba de aceptabilidad sensorial se llevó a cabo en función de los atributos *olor* y *sabor*, utilizando para ello una escala hedónica de nueve puntos (Peryam & Pilgrim, 1957), donde cada punto de la escala fue categorizado según se muestra en la tabla 5.8.

La prueba fue realizada por un panel de consumidores (no entrenados), representativos de la Ciudad de Córdoba (Argentina). Los paneles para las muestras comerciales fueron diferentes que para las muestras de orégano criollo y chileno II.

Tabla 5.8. Categorización de la escala hedónica de 9 puntos para el análisis de aceptabilidad de las muestras de orégano.

Categoría escala hedónica	Descripción
1	Me disgusta muchísimo
2	Me disgusta mucho
3	Me disgusta bastante
4	Me disgusta ligeramente
5	Ni me gusta – ni me disgusta
6	Me gusta ligeramente
7	Me gusta bastante
8	Me gusta mucho
9	Me gusta muchísimo

5.3.2- Metodología para el análisis sensorial de orégano criollo y chileno II

236 jueces de ambos sexos, con edades comprendidas entre 21 y 75 años cuyos criterios de inclusión fueron: no fumadores, sin alergias alimentarias y consumidores de alimentos con orégano al menos una vez por semana.

La degustación de las muestras se realizó utilizando un vehículo o portador (Watts *et al.*, 1992) consistente en pan tipo lactal, liviano, con miga aireada, sin los bordes y cortados en porciones rectangulares (26 mm de ancho x 28 mm de largo x 9 mm de alto) de $2,1 \text{ g} \pm 0,4 \text{ g}$, al cual se adicionaron $0,70 \text{ g} \pm 0,05 \text{ g}$ de puré de tomate, que tenía como únicos ingredientes tomate y sal, al que se le agregó $0,10 \text{ g} \pm 0,04 \text{ g}$ de la muestra de orégano (previamente triturado con procesadora eléctrica y tamizado a $1 \mu\text{m}$).

Para evitar interferencias en la degustación entre las muestras, se indicó a los jueces enjuagar la boca con agua e ingerir un bocado de galletita de agua entre las mismas. En cada sesión se degustaron las tres muestras de orégano ordenadas en forma aleatoria.

A cada juez se le entregó la encuesta para completar (figura 5.3), un plato conteniendo las muestras rotuladas con el número aleatorio asignado según tabla 5.7, un vaso con agua y una galletita de agua (figura 5.4).

Complete por favor la siguiente encuesta

Fecha:

Edad:

Sexo:

Fumador: Sí ☐ No ☐

Con qué frecuencia consume orégano:

- ☐ más de una vez a la semana
- ☐ una vez a la semana
- ☐ una vez al mes
- ☐ nunca

En caso de tener alergia al orégano, pan o tomate no consumir

Marque con una X en el lugar que indique su opinión acerca de cada muestra.

Atributo OLOR a orégano

ESCALA	1288	3524	2549
Me gusta muchísimo (9)	_____	_____	_____
Me gusta mucho (8)	_____	_____	_____
Me gusta bastante (7)	_____	_____	_____
Me gusta ligeramente (6)	_____	_____	_____
Ni me gusta ni me disgusta (5)	_____	_____	_____
Me disgusta ligeramente (4)	_____	_____	_____
Me disgusta bastante (3)	_____	_____	_____
Me disgusta mucho (2)	_____	_____	_____
Me disgusta muchísimo (1)	_____	_____	_____

MUCHAS GRACIAS

Marque con una X en el lugar que indique su opinión acerca de cada muestra.

Atributo GUSTO a orégano

ESCALA	1288	3524	2549
Me gusta muchísimo (9)	_____	_____	_____
Me gusta mucho (8)	_____	_____	_____
Me gusta bastante (7)	_____	_____	_____
Me gusta ligeramente (6)	_____	_____	_____
Ni me gusta ni me disgusta (5)	_____	_____	_____
Me disgusta ligeramente (4)	_____	_____	_____
Me disgusta bastante (3)	_____	_____	_____
Me disgusta mucho (2)	_____	_____	_____
Me disgusta muchísimo (1)	_____	_____	_____

MUCHAS GRACIAS

Figura 5.3. Modelo de encuesta utilizado para la prueba de aceptabilidad sensorial de orégano. Los números de muestra cambiaban de manera aleatoria con respecto al modelo.



Figura 5.4. Material entregado a cada juez para la prueba de aceptabilidad de orégano.

5.3.3- Metodología para el análisis sensorial de muestras comerciales de orégano

80 jueces de ambos sexos, con edades comprendidas entre 17 y 50 años, cuyos criterios de inclusión fueron: no fumadores, sin alergias alimentarias y consumidores de alimentos con orégano al menos una vez por semana.

La degustación de las muestras se realizó utilizando como vehículo pan tipo lactal, liviano, con miga aireada, sin los bordes y cortados en porciones rectangulares (28 mm de ancho x 38 mm de largo x 12 mm de alto) de $3,6 \text{ g} \pm 0,4 \text{ g}$, al cual se adicionaron $0,85 \text{ g} \pm 0,05 \text{ g}$ de puré de tomate, que tenía como únicos ingredientes tomate y sal, al que se le agregó $0,10 \text{ g} \pm 0,04 \text{ g}$ de la muestra de orégano (previamente triturado con procesadora eléctrica y tamizado a $1 \mu\text{m}$).

Para evitar interferencias en la degustación entre las muestras, se indicó a los jueces enjuagar la boca con agua e ingerir un bocado de galletita de agua entre las mismas. En cada sesión se degustaron no más de tres muestras diferentes de orégano y las mismas, siendo el orden de presentación de tipo aleatorio.

A cada juez se le entregó la encuesta para completar (figura 5.2), un plato conteniendo las muestras rotuladas con el número aleatorio asignado según tabla 5.7, un vaso con agua y una galletita de agua (figura 5.3).

5.3.4- *Análisis estadísticos*

Con los resultados de las encuestas del análisis sensorial se obtuvieron frecuencias absolutas y relativas para cada categoría de la escala hedónica. Además, se calcularon medias, medianas y desvíos estándares para cada muestra, y se analizaron las diferencias significativas mediante un análisis de varianza (ANOVA) no paramétrica (Kruskal-Wallis) y test posterior (Prueba de Dunn), para un nivel de significancia del 5% ($\alpha = 0,05$).

La matriz de correlación entre datos químicos y sensoriales se construyó con las *medias* de los atributos sensoriales *olor* y *sabor* frente a los datos de cantidad relativa porcentual de los CVV hallados, definiendo cada muestra como un bloque para el control local. Se determinaron los respectivos coeficientes de correlación de Spearman para un nivel de significancia del 5 % ($\alpha=0,05$).

También se realizó un análisis estadístico multivariado a través de un Análisis de Componentes Principales (PCA) sobre la matriz de correlación de compuestos volátiles por muestra, y a través de un Análisis de Conglomerados (CA) jerárquico con el método de encadenamiento promedio (average linkage) y distancia Euclídea.

En este estudio se utilizó el software Infostat (versión profesional), desarrollado en la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Nacional de Córdoba.

3º PARTE:

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Capítulo 6

Caracterización de compuestos volátiles en especies del género *Tagetes* (Asteraceae)

-
- 6.1- Introducción.
 - 6.2- Optimización del muestreo por HS-SPME.
 - 6.2.1- Selección del tipo de fibra SPME.
 - 6.2.2- Selección de la temperatura de trabajo.
 - 6.2.3- Selección del tiempo de equilibrado del HS.
 - 6.2.4- Selección del tiempo de exposición de la fibra en el HS.
 - 6.3- Caracterización de compuestos volátiles en *Tagetes minuta*.
 - 6.3.1- Comparación entre el análisis por HS-SPME y del aceite esencial.
 - 6.3.2- Diferencias entre la composición de inflorescencias, tallos y hojas.
 - 6.4- Caracterización de compuestos volátiles en *Tagetes filifolia*.
 - 6.4.1- Comparación entre el análisis por HS-SPME y del aceite esencial.
 - 6.4.2- Diferencias entre la composición de inflorescencias, tallos y hojas.
 - 6.5- Caracterización de compuestos volátiles en *Tagetes argentina*.
 - 6.5.1- Comparación entre el análisis por HS-SPME y del aceite esencial.
 - 6.5.2- Diferencias entre la composición de inflorescencias, tallos y hojas.
 - 6.6- Comparación de la composición de volátiles en las tres especies de *Tagetes*.
-

6.1- Introducción

El género *Tagetes* (Asteraceae) comprende 56 especies, incluyendo plantas anuales y perennes, principalmente herbáceas (Senatore *et al.*, 2004). El género es nativo de América del Norte y del Sur, pero algunas especies fueron llevadas a Europa en el siglo XVI (Marotti *et al.*, 2004) por lo que, en la actualidad, se han naturalizado en todo el mundo (Moradalizadeh *et al.*, 2013). Al ser fácil de cultivar, tiene una larga historia de uso humano (Ghiasvand *et al.*, 2011) como plantas polivalentes (Senatore *et al.*, 2004), utilizadas con fines ornamentales, medicinales y alimenticios, entre otros (Vasudevan *et al.*, 1997; Moghaddam *et al.*, 2007; Ghiasvand *et al.*, 2011; Moradalizadeh *et al.*, 2013). En el caso particular de Argentina, el género *Tagetes* está representado por 12 especies, de las cuales 5 son endémicas (Barboza *et al.*, 2006). En la provincia de Córdoba crecen 3 especies principalmente, *T. minuta* L., *T. filifolia* Lag. y *T. argentina* Cabrera (Barboza *et al.*, 2006).

Tagetes minuta L. (Figura 6.1) es conocida en Argentina como *suico* o *chinchilla* (Barboza *et al.* 2006), la cual se cultiva para obtener su aceite esencial, que se comercializa en la industria del sabor y de la perfumería bajo la marca “*Aceite de Tagetes*” (Babu & Kaul, 2007;

Ghiasvand *et al.*, 2011). Este aceite se utiliza en la elaboración de diversos productos alimenticios, incluyendo cola y bebidas alcohólicas, postres, lácteos, dulces, gelatinas y condimentos, entre otros (Babu & Kaul, 2007). Además, hay evidencia de que varios de sus metabolitos secundarios tienen actividad biológica contra hongos (Dunkel *et al.*, 2010; Obongoya *et al.*, 2010; Shahzadi *et al.*, 2010), bacterias (Senatore *et al.*, 2004; Lambrecht Gonçalves *et al.*, 2013; Ali *et al.*, 2014; Shirazi *et al.*, 2014), parásitos (Eguaras *et al.*, 2005) e insectos (Irerí *et al.*, 2010; Tankeu *et al.*, 2013), a través de diversos mecanismos (Ghiasvand *et al.*, 2011), como por ejemplo, repelencia contra mosquitos (Wanzala & Ogoma, 2013). Además, se estudió su capacidad antioxidante, citotóxica (Ali *et al.*, 2014; Shirazi *et al.*, 2014), antiinflamatoria (Karimian *et al.*, 2014) y alelopática (Batish *et al.*, 2007; López *et al.*, 2008). Su valor medicinal en los seres humanos se ha demostrado para algunos compuestos secundarios estrechamente relacionados con la planta (Hansch *et al.*, 1989; Ghiasvand *et al.*, 2011), aunque no se han reportado estudios en humanos (Ghiasvand *et al.*, 2011). En medicina popular, *T. minuta* ha sido utilizada como antihelmíntica, diurética, antiespasmódica y para el tratamiento de enfermedades intestinales y del estómago (El-Deeb *et al.*, 2004; Arias Toledo, 2009). También se consume como un té medicinal para la gastritis y la indigestión (Tankeu *et al.*, 2013). Además, se utiliza tópicamente en el tratamiento de callosidades, verrugas, infecciones de la piel y hemorroides (Tankeu *et al.*, 2013).



Figura 6.1. *Tagetes minuta* L. ¹

Tagetes filifolia Lag. (Figura 6.2) es conocida en Argentina como *anisillo*, *anís del campo* o *anís de las sierras* (Barboza *et al.*, 2006), los cuales indican la similitud entre el aroma de esta planta y el del anís (De Feo *et al.*, 1998). De hecho, las partes aéreas secas de la planta se usan como saborizante en alimentos (Roersch & Van Der Hoogte, 1988). Se han reportado estudios sobre la actividad biológica de su aceite esencial contra insectos tales como mosquito *Aedes*

¹ Fuente <http://www.botanicayjardines.com/tagetes-minuta/>

aegypti (Gleiser *et al.*, 2011), mosquita blanca (*Trialeurodes vaporariorum* y *Bemisia tabaci*), pulgón (*Aphis melifera*) y paratrioza (*Paratrioza cockerelli*) (Serrato Cruz & Barajas Pérez, 2006), por lo que es en una importante alternativa ecológica y económica a los insecticidas sintéticos (Serrato Cruz, 2003). Se ha demostrado también que *T. filifolia* tiene actividad biológica contra bacterias (Miller *et al.*, 2015), hongos (Pawar & Thaker, 2007; Miller *et al.*, 2015) y parásitos (Calderón *et al.*, 2010). En medicina popular, las infusiones de sus partes aéreas se usan como diurético, antiespasmódico, antiinflamatorio, antihemorrágico, diaforético, emenagogo, y carminativo (De Feo *et al.*, 1998; Villarreal, 2003; Serrato Cruz & Barajas Pérez, 2006; González & Garciglia, 2013). Adicionalmente se utiliza por su fragancia en perfumería y como planta ornamental (Marotti *et al.*, 2004).



Figura 6.2. *Tagetes filifolia* Lag.²

Tagetes argentina Cabrera (Figura 6.3) es la menos estudiada de todas las especies que crecen en Córdoba, como lo demuestra el menor número de publicaciones al respecto. Esta planta es comúnmente conocida como *chil chil del campo* o *chinchigua* (Barboza *et al.*, 2006). Se la encuentra frecuentemente en lugares húmedos y como hierba entre cultivos (Gutiérrez & Katinas, 2003). En medicina popular se ha utilizado como diurético y digestivo (Barboza *et al.*, 2006), carminativo y eupéptico (Del Vitto *et al.*, 1997).

² Fuente <http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/asteraceae/tagetes-filifolia/fichas/pagina1.htm>



Figura 6.3. *Tagetes argentina* Cabrera (Zuloaga *et al.* 2008).

En este capítulo se describe la optimización de una técnica de HS-SPME en términos de tipos de fibras, temperatura de extracción, tiempo de equilibrio y tiempo de extracción, para la caracterización de CVV en *T. minuta*, *T. filifolia* y *T. argentina*.

6.2- Optimización del muestreo por HS-SPME

6.2.1- Selección del tipo de fibra SPME

La naturaleza química del analito determina el tipo de revestimiento eficaz para su extracción, que, como se vio en el Capítulo 3, se basa principalmente en las características de polaridad y volatilidad del analito. La figura 6.4 muestra el efecto del tipo de fibra sobre el área total de picos y sobre el área de los picos de los componentes mayoritarios de *T. minuta*. El orden de eficiencia de extracción de CVV determinada a partir del área total fue: DVB-CAR-PDMS \geq PDMS > CAR-PDMS > PDMS-DVB \geq PA, siendo las fibras DVB-CAR-PDMS y PDMS las

que lograron un 40% mayor de extracción que el resto de las fibras estudiadas. Cuando se realizó el análisis de varianza (ANOVA) con test de Tukey para las áreas totales (Tabla 6.1), no hubo diferencias significativas entre las fibras DVB-CAR-PDMS y PDMS, ni entre las fibras PA, CAR-PDMS y PDMS-DVB, pero si entre el primer grupo y el segundo ($p < 0,05$).

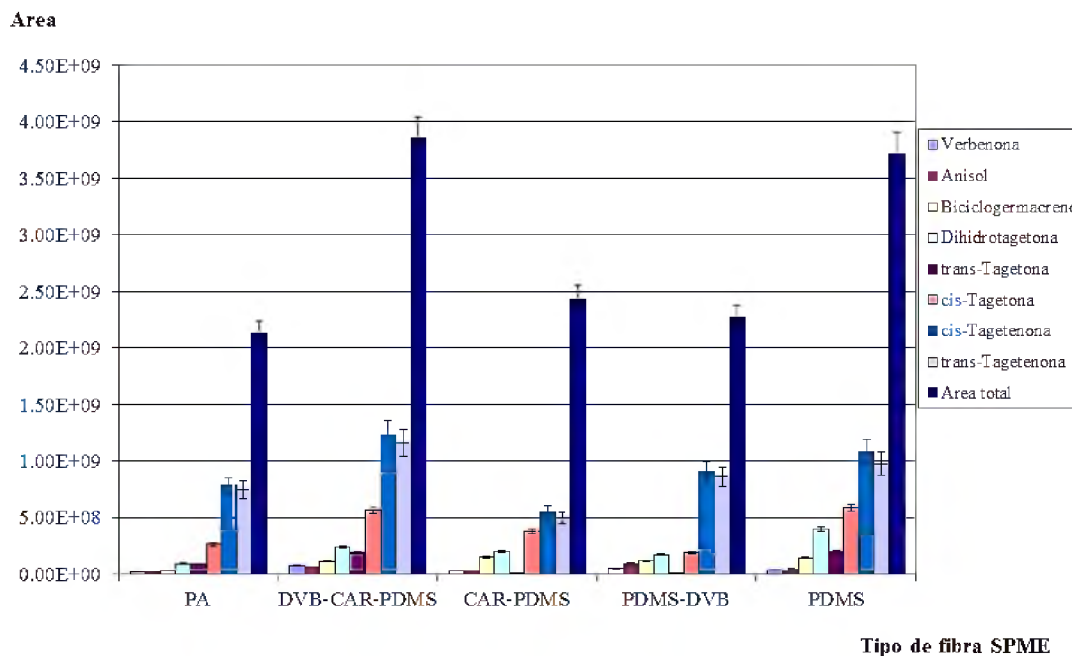


Figura 6.4. Efecto del tipo de fibra sobre el proceso de microextracción de componentes volátiles de *T. minuta*.

Se observaron diferencias en la extracción de algunos componentes principales. Por ejemplo, dihidrotagetenona, anisol y bicyclogermacreno fueron extraídos en mayor proporción por la fibra PDMS, mientras que verbenona, *cis* y *trans*-tagetenona, por la fibra DVB-CAR-PDMS. La cantidad extraída de *cis* y *trans*-tagetona fue muy similar en ambos tipos de recubrimiento.

Los resultados probablemente se debieron al hecho de que la mayoría de los analitos de la muestra son de polaridad baja a media, por lo que la combinación de la fibra DVB-CAR-PDMS proporcionó una buena eficiencia de extracción, lo que también se ha demostrado en una amplia gama de analitos con diferentes polaridades y pesos moleculares (Hamm *et al.*, 2003; Pellati *et al.*, 2005; Ho *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2007; Pawliszyn, 2012; Merkle *et al.*, 2015).

Debido a que no hubo diferencias significativas en la extracción de volátiles por las fibras DVB-CAR-PDMS y PDMS (Tabla 6.1), se seleccionó la fibra DVB-CAR-PDMS para los análisis sucesivos.

6.2.2- Selección de la temperatura de trabajo

La figura 6.5 muestra el efecto de la temperatura de microextracción sobre el área total de picos y sobre el área de los picos de los componentes mayoritarios. El aumento de temperatura incrementa el área total de picos, aunque no de manera significativa, como muestran los resultados del ANOVA de la tabla 6.1. Sin embargo, la temperatura ejerce un efecto diferente en cada compuesto particular. En el caso de *cis* y *trans*-tagetona, las áreas de sus picos aumentan con la temperatura, mientras que las de *cis* y *trans*-tagetona disminuyen. Asimismo, la temperatura no afecta el área de los picos de dihidrotagetona, anisol, verbenona o biciclogermacreno. Estas diferencias pueden estar relacionadas con el efecto de la temperatura sobre sus coeficientes de distribución entre el HS y la fibra, que, como se vio en el Capítulo 3, hay casos en los que aumentan y otros en los que disminuyen con la temperatura, dependiendo de sus puntos de ebullición (Wercinski, 1999; Pawliszyn, 2012). Cabe destacar que se obtuvieron efectos similares en otros trabajos de optimización de HS-SPME (Hamm *et al.*, 2003; Câmara *et al.*, 2007; Ma *et al.*, 2013). Por lo tanto, y ya que no hubo diferencias significativas en las áreas totales (Tabla 6.1), se seleccionó la temperatura de 40 °C como la menor temperatura posible que logra una buena eficiencia de extracción (Kolb & Ettre, 2006; Pawliszyn, 2012).

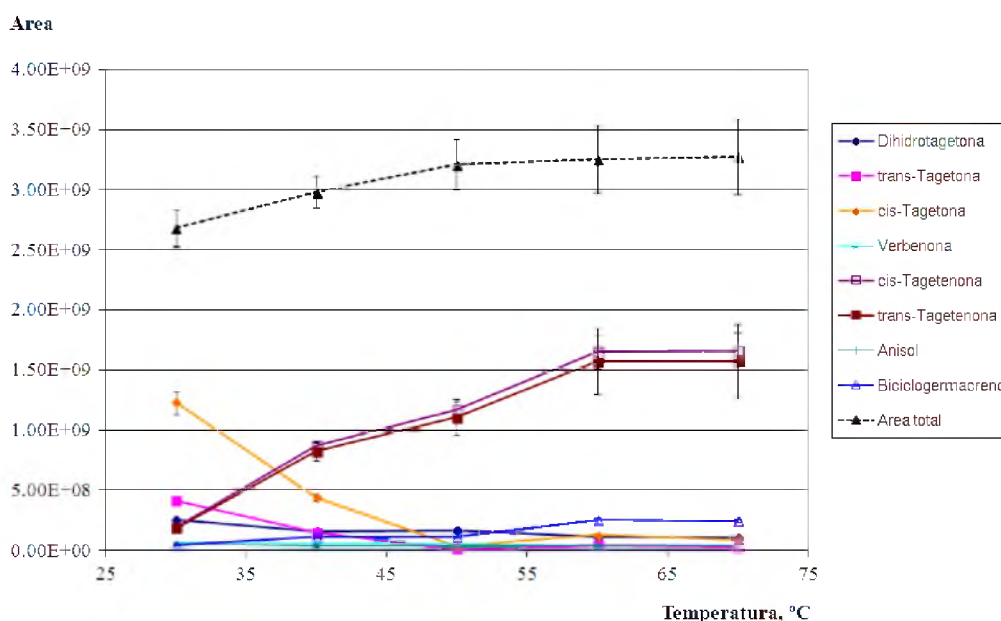


Figura 6.5. Efecto de la temperatura sobre el proceso de microextracción de componentes volátiles de *T. minuta*.

6.2.3- Selección del tiempo de equilibrado del HS

La figura 6.6 muestra el efecto del tiempo de equilibrado del HS sobre el área total de picos de los cromatogramas y sobre el área de los picos mayoritarios. El incremento en el tiempo de equilibrio del HS provoca un aumento del área total y del área de los componentes principales de los cromatogramas hasta los 10 minutos, tiempo a partir del cual los parámetros permanecen relativamente constantes. Cuando se realizó un ANOVA (Tabla 6.1), no hubo diferencias significativas en los diferentes tiempos estudiados, razón por la cual se optó por equilibrar el HS durante 10 minutos. Resultados similares han sido informados en otros estudios de optimización, con tiempos óptimos de 10 min de equilibrado del HS o incluso menores (Ma *et al.*, 2013).

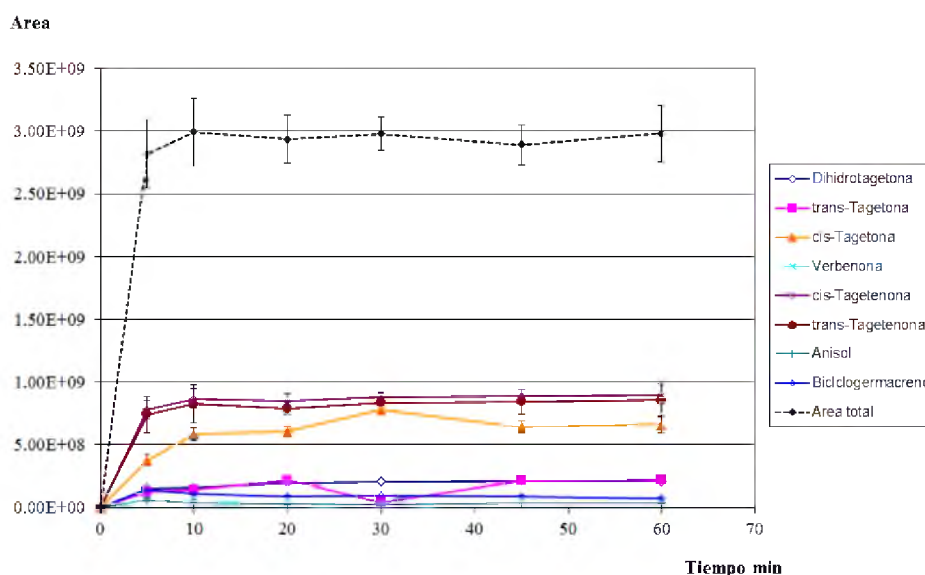


Figura 6.6. Efecto del tiempo de equilibrado del HS sobre el proceso de microextracción de componentes volátiles de *T. minuta*.

6.2.4- Selección del tiempo de exposición de la fibra en el HS

La figura 6.7 muestra el efecto del tiempo de exposición de la fibra en el HS sobre el proceso de microextracción. Aquí se puede observar que, al aumentar el tiempo de exposición, aumenta el área total de picos de cromatograma hasta los 30 minutos, tiempo a partir del cual permanece aproximadamente constante. Lo mismo sucede con las áreas correspondientes a *cis* y *trans* tagetenona, sin embargo, no se observa una gran influencia del tiempo de exposición sobre las áreas de los otros componentes mayoritarios de *T. minuta*. Cuando se realizó un

ANOVA (Tabla 6.1), no hubo diferencias significativas entre las áreas a los 10 y 20 minutos, así como tampoco entre 30, 45 y 60 minutos (Tabla 6.1). Por todo lo anterior, se seleccionó un tiempo de extracción de 30 min.

En la tabla 6.1 se muestran los valores de las áreas totales obtenidas con sus respectivas desviaciones estándares y los resultados del test Tukey ($p < 0,05$) del ANOVA sobre los datos de optimización de las condiciones experimentales para el análisis de CVV de especies del género *Tagetes*.

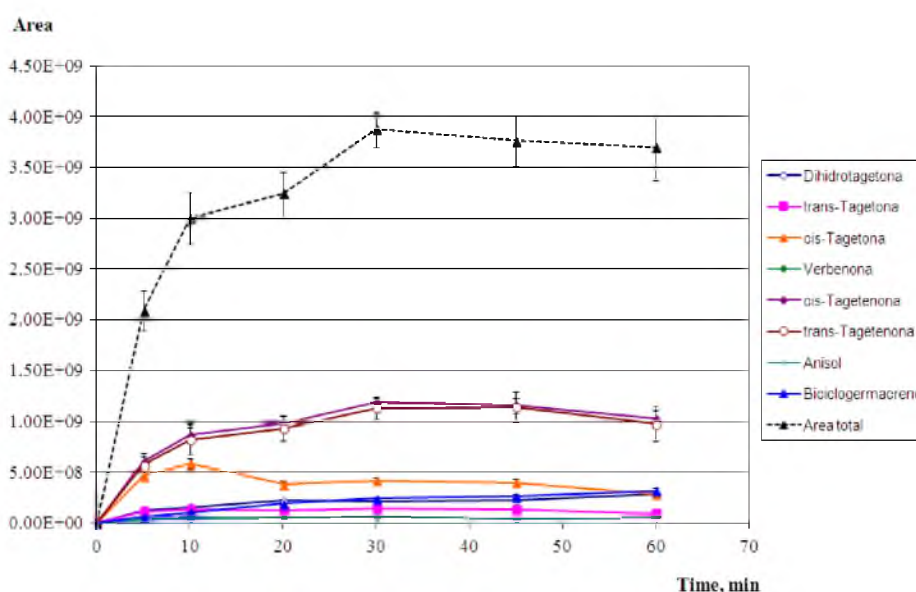


Figura 6.7. Efecto del tiempo de exposición de la fibra en el HS sobre el proceso de microextracción de componentes volátiles de *T. minuta*.

A partir de los resultados de optimización, se puede concluir que el tiempo de exposición de la fibra, ejerce mayor influencia sobre la microextracción de CVV de *T. minuta* que el tiempo de equilibrado del HS. Resultados similares se encontraron en la literatura para el muestreo de volátiles en diversos tipos de muestras (Hamm *et al.*, 2003; Câmara *et al.*, 2007; Ma *et al.*, 2013). Por lo tanto, las condiciones adoptadas para análisis de especies de *Tagetes* son: fibra extractante: DVB-CAR-PDMS; temperatura de extracción: 40 °C; 10 minutos de equilibrio del HS y 30 minutos de exposición de la fibra en el HS.

Tabla 6.1. Resultados del ANOVA sobre los datos de optimización de las condiciones experimentales para el análisis de CVV en especies del género *Tagetes spp.*

Variable	Categoría	Área total	SD ¹	Test Tukey ²
Tipo de fibra	CAR-PDMS	2,43E+09	1,3E+08	A
	PA	2,26E+09	9,3E+07	A
	PDMS-DVB	2,44E+09	1,7E+08	A
	PDMS	3,72E+09	1,1E+08	B
	DVB-CAR-PDMS	3,85E+09	1,5E+08	B
Temperatura (°C)	30	2,68E+09	1,5E+08	A
	40	2,98E+09	1,3E+08	A
	50	3,21E+09	2,1E+08	A
	60	3,26E+09	2,8E+08	A
	70	3,28E+09	3,1E+08	A
Tiempo de equilibrado del HS (min)	5	2,82E+09	2,7E+08	A
	10	2,99E+09	2,7E+08	A
	20	2,94E+09	1,9E+08	A
	30	2,98E+09	1,3E+08	A
	45	2,89E+09	1,6E+08	A
	60	2,98E+09	2,2E+08	A
Tiempo de exposición de la fibra (min)	5	2,09E+09	2,0E+08	A
	10	3,00E+09	2,5E+08	B
	20	3,24E+09	2,1E+08	B, C
	30	3,87E+09	1,7E+08	C
	45	3,76E+09	2,4E+08	C
	60	3,69E+09	3,1E+08	C

¹ Desviación estándar de determinaciones por triplicado.

² Letras distintas indican diferencias significativas (p<0,05).

6.3- Caracterización de compuestos volátiles en *Tagetes minuta*

Se caracterizaron los CVV de muestras de planta entera de *T. minuta* por las técnicas de HD y HS-SPME. Los resultados se utilizaron para compararlos entre sí y con los obtenidos a partir de las demás especies de *Tagetes* estudiadas. Por otro lado, también se analizaron por HS-SPME las partes aéreas por separado (hojas, inflorescencias y tallos), con la finalidad de determinar similitudes y diferencias en la producción de CVV. Todos los resultados se resumen en la tabla 6.2, y las estructuras químicas de algunos de los CVV hallados se muestran en la figura 6.8.

Tabla 6.2. Componentes volátiles hallados en *T. minuta* L. por análisis del aceite esencial y HS-SPME, usando una fibra DVB-CAR-PDMS 50/30 μm ; temperatura de extracción de 40 $^{\circ}\text{C}$; 10 minutos de equilibrio del HS y 30 minutos de exposición de la fibra en el HS. Se muestran valores promedios de tres determinaciones, cuyos coeficientes de variación (CV) fueron menores al 5 %.

Pico	t_R^a (min)	Compuesto ^b	% ^c					KI_e^d	KI_r^e
			I. ^f	H. ^g	T. ^h	P. E. ⁱ	A. E. ^j		
1	8,68	crotonitrilo	ND ^a	0,8 ^c	ND ^a	ND ^a	0,4 ^b	664	664
2	13,00	sabineno	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	0,5 ^b	974	974
3	13,73	mirreno	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	0,1 ^b	993	993
4	15,16	limoneno	0,2	0,7	0,6	0,5	3,2	1032	1033
5	15,71	dihidrotagetona	6,4 ^c	1,7 ^a	15,4 ^c	5,6 ^b	9,7 ^d	1047	1047
6	15,75	fenilacetaldehído	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	0,1 ^b	1049	1049
7	15,93	<i>cis</i> - β -ocimeno	0,2	ND	0,6	0,1	0,3	1054	1054
8	16,10	<i>trans</i> - β -ocimeno	0,3	0,6	ND	0,6	2,8	1058	1058
9	16,96	β -tuyona	1,1 ^c	1,1 ^c	ND ^a	1,1 ^c	0,5 ^b	1082	1081
10	17,40	α -piridona	0,6 ^c	1,1 ^d	ND ^a	1,2 ^d	0,1 ^b	1095	1094
11	17,71	α -terpinoleno	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	1,1 ^b	1104	1100
12	17,90	filifolona	0,6 ^c	1,9 ^d	ND ^a	0,9 ^c	0,1 ^b	1109	1083
13	18,14	N.I. *	ND	ND	ND	ND	0,2	1117	
14	18,23	crisantenona	0,8 ^c	0,8 ^c	ND ^a	0,7 ^c	0,1 ^b	1120	1121
15	18,38	N.I. *	ND	0,1	ND	ND	0,1	1124	
16	18,52	N.I. *	ND	ND	ND	ND	0,2	1128	
17	18,62	<i>allo</i> -ocimeno	0,8 ^c	1,0 ^c	ND ^a	2,9 ^d	0,2 ^b	1131	1132
18	18,72	<i>cis</i> -epoxiocimeno	2,6 ^b	0,8 ^a	3,4 ^c	0,5 ^a	0,6 ^a	1135	1139
19	19,09	<i>trans</i> -epoxiocimeno	1,3 ^c	0,3 ^b	ND ^a	0,2 ^b	0,1 ^b	1146	1141
20	19,27	<i>trans</i> -tagetona	0,8 ^a	7,6 ^d	0,4 ^a	3,3 ^c	1,9 ^b	1151	1149
21	19,65	<i>cis</i> -tagetona	7,7 ^c	7,9 ^c	1,6 ^b	9,9 ^d	0,2 ^a	1163	1156
22	19,99	<i>p</i> -cimen-8-ol	5,6 ^c	2,7 ^c	ND ^a	3,9 ^d	1,4 ^b	1173	1172
23	20,29	4-terpineol	ND	ND	ND	ND	0,2	1183	1182
24	20,70	N.I. *	ND	ND	ND	ND	0,8	1195	
25	20,93	carvona	0,6	0,1	ND	0,5	4,3	1202	1200
26	21,18	mentofurano	ND	ND	ND	ND	2,1	1211	1187
27	21,33	verbenona	7,4	2,6	ND	5,0	0,3	1216	1218
28	21,59	2-fenil-1,3-dioxolano	ND	ND	ND	ND	0,5	1224	1215
29	21,81	<i>cis</i> -tagetenona	17,8	29,0	1,0	15,4	20,9	1231	1232
30	22,52	<i>trans</i> -tagetenona	26,1	10,2	3,0	14,2	32,3	1255	1252
31	22,73	N.I. *	ND	ND	ND	ND	0,4	1262	
32	22,92	anisol	ND ^a	3,0 ^c	ND ^a	7,9 ^d	1,4 ^b	1268	1265
33	23,24	N.I. *	ND	ND	ND	ND	0,2	1279	
34	23,36	piperitona	1,5 ^b	1,1 ^b	0,4 ^a	1,8 ^b	1,5 ^b	1283	1282
35	23,86	<i>trans</i> -pinocarvil acetato	4,2 ^c	2,2 ^b	ND ^a	3,9 ^c	7,1 ^d	1299	1298
36	23,99	<i>trans</i> -anetol	0,5 ^b	1,3 ^c	0,8 ^b	0,5 ^b	0,1 ^a	1304	1301
37	24,19	piperitenona	0,3 ^b	0,1 ^b	ND ^a	0,3 ^b	0,1 ^b	1311	1310
38	24,80	N.I. *	ND ^a	0,2 ^b	ND ^a	0,4 ^b	ND ^a	1332	
39	24,90	eugenol	0,5 ^b	0,2 ^b	0,4 ^b	0,1 ^b	ND ^a	1336	1337
40	25,27	metileugenol	0,7 ^b	1,5 ^c	3,6 ^d	1,1 ^b	0,1 ^a	1349	1348
41	25,49	δ -elemeno	1,1 ^c	0,4 ^b	2,9 ^d	1,6 ^c	ND ^a	1357	1353
42	25,58	α -cubebeno	0,1	0,2	0,3	0,1	0,1	1360	1358
43	26,20	N.I. *	ND	0,1	ND	ND	0,4	1382	
44	26,35	N.I. *	0,1	ND	0,4	0,1	ND	1387	
45	26,57	α -copaeno	0,2 ^b	0,1 ^b	7,3 ^c	0,3 ^b	ND ^a	1395	1392
46	26,89	β -longipineno	2,6 ^c	1,4 ^b	1,4 ^b	2,0 ^{b,c}	0,4 ^a	1406	1403
47	27,11	N.I. *	0,1	ND	ND	ND	ND	1415	
48	27,20	β -elemeno	ND ^a	ND ^a	1,1 ^b	ND ^a	ND ^a	1418	1420
49	27,54	β -cariofileno	0,6 ^a	2,3 ^b	3,3 ^c	3,5 ^c	0,3 ^a	1431	1430
50	27,61	α -cariofileno	1,3 ^c	0,3 ^b	9,8 ^d	ND ^a	ND ^a	1433	1433
51	27,92	N.I. *	0,1	0,3	ND	0,1	0,1	1445	
52	28,11	aromadendreno	0,6 ^a	2,4 ^b	6,2 ^c	0,2 ^a	0,1 ^a	1452	1452
53	28,19	N.I. *	0,1	ND	0,5	0,9	0,1	1455	
54	28,50	calareno	0,6 ^a	0,4 ^a	8,6 ^b	0,1 ^a	0,2 ^a	1467	1467
55	28,59	N.I. *	ND	ND	0,3	1,6	ND	1470	

Tabla 6.2. Continuación.

Pico	t _R ^a (min)	Compuesto ^b	% ^c					KI _e ^d	KI _r ^e
			I. ^f	H. ^g	T. ^h	P. E. ⁱ	A. E. ^j		
56	28,66	N.I.*	ND	0,3	0,4	ND	ND	1473	
57	29,06	α -amorfeno	0,1 ^a	0,6 ^b	0,7 ^b	0,1 ^a	ND ^a	1488	1485
58	29,22	germacreno D	0,9 ^a	2,7 ^c	4,8 ^d	1,9 ^b	0,3 ^a	1494	1492
59	29,42	<i>trans</i> - α -farneseno	ND ^a	0,2 ^b	0,5 ^b	ND ^a	0,7 ^b	1502	1502
60	29,67	biciclogermacreno	2,9 ^b	6,8 ^d	16,1 ^e	4,7 ^c	0,02 ^a	1512	1511
61	29,88	β -cadineno	ND ^a	ND ^a	0,6 ^b	ND ^a	ND ^a	1520	1520
62	30,03	γ -cadineno	0,1	0,3	0,6	0,1	0,1	1526	1525
63	30,22	δ -cadineno	0,1 ^a	0,5 ^a	1,6 ^b	0,3 ^a	0,1 ^a	1533	1533
64	30,59	spatulenol	ND ^a	0,1 ^b	0,2 ^b	ND ^a	ND ^a	1548	1549
65	31,65	N.I.*	ND	0,1	ND	ND	0,3	1590	
66	31,84	guaiol	ND ^a	ND ^a	0,8 ^c	ND ^a	0,2 ^b	1598	1598
67	33,23	α -cadinol	ND ^a	ND ^a	0,4 ^b	ND ^a	ND ^a	1656	1656
68	37,43	neofitadieno	ND ^a	0,3 ^b	ND ^a	ND ^a	0,2 ^b	1839	1837
Total			100,0	100,0	100,0	100,0	100,0		
% Compuestos identificados			90,2	87,2	88,6	88,1	81,5		
% Área Identificada			99,8	99,0	98,4	96,8	97,2		

* Tiempo de retención; ^b Identificado por GC-MS; ^c Cuantificado por GC-FID, letras distintas indican diferencias significativas del ANOVA con test Tukey ($p < 0,05$); ^d Índice de retención de Kovat's experimental; ^e Índice de retención de Kovat's de literatura; ^f Inflorescencias; ^g Hojas; ^h Tallos; ⁱ Planta Entera; ^j Aceite Esencial; * Compuesto no identificado; ND: No detectado.

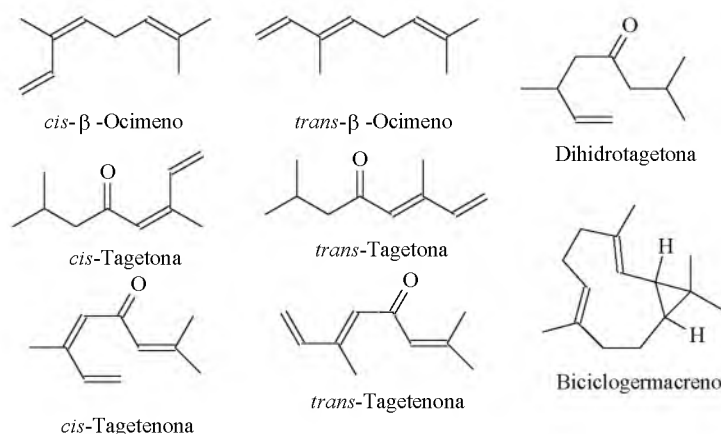


Figura 6.8. Algunos componentes volátiles hallados en *T. minuta* por análisis del aceite esencial y por muestreo mediante HS-SPME.³

6.3.1- Comparación entre el análisis por HS-SPME y del aceite esencial

La composición del AE de *T. minuta* ha sido informada por varios investigadores que han identificado *cis* y *trans*- β -ocimeno, dihidrotagetona, *cis* y *trans*-tagetona, y *cis* y *trans*-tagetenona como componentes principales (Figura 6.8) (Zygadlo *et al.*, 1990; Gil *et al.*, 2000; Senatore *et al.*, 2004), aunque también se ha demostrado que las composiciones de CVV en *T. minuta* pueden resultar muy variables según la parte de la planta estudiada (Thappa *et al.*, 1993; Chamorro *et al.*, 2008; Meshkatsadat *et al.*, 2010), su estadio de crecimiento (Thappa *et al.*, 1993; Moghaddam *et al.*, 2007; Chamorro *et al.*, 2008; Meshkatsadat *et al.*, 2010), su

³ Fuente de las estructuras químicas: Base de datos NIST: <http://webbook.nist.gov/chemistry/>

quimiotipo (Gil *et al.*, 2000; Moghaddam *et al.*, 2007; Meshkatsadat *et al.*, 2010) y su origen geográfico (Chalchat *et al.*, 1995; Gil *et al.*, 2000; Chamorro *et al.*, 2008; Meshkatsadat *et al.*, 2010; Moradalizadeh *et al.*, 2013; Tankeu *et al.*, 2013). Esas diferencias de composición que varían según factores intrínsecos y/o extrínsecos, responden a diferentes demandas fisiológicas asociadas con el crecimiento, la reproducción y la defensa (Herms & Mattson, 1992; Singh *et al.*, 1992; Gil *et al.*, 2000). En este caso, tanto en el AE como en el muestreo por HS-SPME, los CVV mayoritarios fueron *cis*-tagetenona y *trans*-tagetenona, aunque en cantidades diferentes (20,9 y 32,3 % en el AE respectivamente; y 15,4 y 14,2 % por HS-SPME respectivamente).

Comparando los resultados del AE y los datos de HS-SPME, la mayoría de los componentes fueron los mismos y coincidentes con lo descrito en literatura, aunque hay algunas diferencias entre ellos pueden ser observadas:

(a) Algunas de las concentraciones se invirtieron, como es el caso de *trans*-tagetenona que fue el componente mayoritario en el AE, mientras que en el análisis por HS-SPME lo fue *cis*-tagetenona.

(b) Se encontró una cantidad de biciclogermacreno mayor por HS-SPME que en el AE, lo cual puede tener dos justificaciones posibles: por un lado, probablemente se debió a una mayor afinidad de la fibra por dicho componente, lo que provocó su mayor preconcentración (Wercinski, 1999; Pawliszyn, 2012); pero por otra parte, quizá la emisión de CVV sea más rica en este volátil que los reservorios que pueden extraerse por hidrodestilación (Ormeño *et al.*, 2008, 2011; Kegge *et al.*, 2015), lo cual se hace probable al observar que su proporción en los tallos es diferente a hojas e inflorescencias. Además, dado el peso molecular y polaridad de biciclogermacreno, es más probable que su extracción sea por absorción en la fase de PDMS (Silva *et al.*, 2014), cuyo proceso es no competitivo e independiente de la matriz de la muestra, como se vio en el Capítulo 3 (Wercinski, 1999; Pawliszyn, 2012).

6.3.2- *Diferencias entre la composición de inflorescencias, tallos y hojas*

Trans-tagetenona y *cis*-tagetenona fueron los componentes mayoritarios en hojas e inflorescencias, aunque en porcentajes diferentes, mientras que en tallos lo fueron biciclogermacreno y dihidrotagetona.

Comparando los resultados obtenidos en las diferentes partes aéreas de *T. minuta*, se pueden observar mayores similitudes entre hojas e inflorescencias en cuanto a los compuestos mayoritarios y minoritarios. Algunas de las diferencias más importantes fueron:

- (a) Anisol, crotonitrilo y neofitadieno se encontraron exclusivamente en hojas.
- (b) Las composiciones de dihidrotagetona y biciclogermacreno fueron diferentes en hojas e inflorescencias.
- (c) β -Elemeno, β -cadineno, guaiol y α -cadinol se detectaron solamente en los tallos.
- (d) La proporción de *cis* y *trans*-tagetenona (componentes mayoritarios en hojas e inflorescencias), fue baja en los tallos.

Otros investigadores también hallaron diferencias en la composición del AE de hojas y flores (Chamorro *et al.*, 2008), y de hojas, flores y semillas (Moradalizadeh *et al.*, 2013).

6.4- Caracterización de compuestos volátiles en *Tagetes filifolia*

Los CVV de *T. filifolia* se caracterizaron por HS-SPME, y los resultados se resumen en la tabla 6.3. Las estructuras químicas de los CVV mayoritarios se muestran en la figura 6.9.

Tabla 6.3. Componentes volátiles hallados en *T. filifolia* Lag. por HS-SPME, usando una fibra DVB-CAR-PDMS 50/30 μ m; temperatura de extracción de 40 °C; 10 minutos de equilibrio del HS y 30 minutos de exposición de la fibra en el HS. Se muestran valores promedios de tres determinaciones, cuyos CV fueron menores al 5 %.

Pico	t_R (min) ^a	Compuesto ^b	KI ^c	KI _r ^d	% ^e			
					I:	H:	T:	PE:
1	9,30	<i>cis</i> -3-hexenol	839	839	ND ^a	0,3 ^b	ND ^a	0,2 ^b
2	17,43	1-undeceno	1095	1095	ND ^a	ND ^a	0,4 ^b	0,1 ^b
3	21,25	estragol	1213	1208	16,3 ^a	27,1 ^c	19,7 ^b	22,3 ^{b,c}
4	22,82	aldehído anísico	1265	1270	1,5 ^b	1,6 ^b	1,2 ^a	2,0 ^b
5	24,15	<i>trans</i> -anetol	1309	1301	51,2 ^b	61,8 ^c	38,0 ^a	57,1 ^c
6	24,80	N.I. *	1332	-	ND	0,1	0,06	ND
7	24,85	eugenol	1334	1337	0,2	0,3	0,2	0,4
8	25,11	duraldehído	1343	1340	ND ^a	ND ^a	0,1 ^b	ND ^a
9	25,09	metil eugenol	1342	1347	0,3	0,2	0,1	0,3
10	25,31	δ -elemeno	1350	1348	0,7 ^b	0,4 ^b	ND ^a	0,6 ^b
11	25,64	α -cubebeno	1362	1358	0,7 ^a	0,1 ^a	1,9 ^b	0,4 ^a
12	25,62	N.I. *	1361	-	ND	ND	0,1	ND
13	26,09	β -maaliemo	1378	1381	ND	ND	0,1	0,05
14	26,26	α -ylangeno	1384	1382	0,2	0,03	0,4	0,1
15	26,39	α -copaeno	1388	1390	0,3	0,06	ND	0,2
16	26,55	isoledeno	1394	1392	0,7 ^b	0,07 ^a	7,8 ^c	1,2 ^b
17	26,65	β -longipineno	1398	1403	0,11	0,03	ND	ND
18	26,74	α -isocomeno	1401	1405	1,0 ^b	0,1 ^a	6,7 ^c	1,2 ^b

Tabla 6.3. Continuación.

Pico	t _R (min) ^a	Compuesto ^b	KI _e ^c	KI _r ^d	% ^e			
					I:	H:	T:	PE:
21	26,91	iso-longifoleno	1407	1406	0,3 ^b	0,06 ^b	ND ^a	0,2 ^b
22	27,07	iso-cariofileno	1413	1414	0,1	0,2	0,5	0,2
23	27,30	β-elemeno	1422	1420	0,3 ^b	0,06 ^a	4,0 ^c	0,6 ^b
24	27,42	N.I. *	1426	-	0,07	ND	ND	ND
25	27,57	β-cariofileno	1432	1430	0,8 ^b	0,2 ^a	2,6 ^c	0,6 ^b
26	27,82	trans-α-bergamoteno	1441	1440	0,6 ^b	ND ^a	0,05 ^b	0,3 ^b
27	27,94	cloveno	1446	1444	0,3	0,1	0,4	0,1
28	28,02	aristoleno	1449	1450	0,2 ^b	0,1 ^b	ND ^a	0,1 ^b
29	28,13	aromadendreno	1453	1452	0,7 ^b	0,4 ^{a,b}	0,1 ^a	0,5 ^{a,b}
30	28,22	allo-aromadendreno	1456	1459	0,2 ^b	0,1 ^b	ND ^a	0,2 ^b
31	28,29	α-elemeno	1459	1460	0,4 ^b	0,06 ^b	ND ^a	0,2 ^b
32	28,42	trans-β-farneseno	1464	1464	0,6	0,07	0,4	0,2
33	28,48	α-humuleno	1466	1465	ND ^a	ND ^a	0,6 ^b	0,3 ^b
34	28,50	calareno	1467	1467	0,4 ^b	0,07 ^b	ND ^a	0,2 ^b
35	28,76	epi-biciclosesquifelandreno	1477	1471	1,0 ^c	0,3 ^b	ND ^a	0,3 ^b
36	29,12	α-amorfenoleno	1490	1485	1,6 ^c	0,06 ^b	ND ^a	0,08 ^b
37	29,08	γ-muroleno	1489	1489	ND ^a	0,3 ^b	ND ^a	0,6 ^b
38	29,16	valenceno	1492	1493	ND ^a	0,2 ^b	4,6 ^d	1,0 ^c
39	29,28	germacreno D	1496	1493	3,1 ^c	0,5 ^b	ND ^a	0,7 ^b
40	29,45	α-zingibereno	1503	1498	0,3 ^b	0,2 ^b	ND ^a	0,2 ^b
41	29,57	α-muureleno	1507	1506	1,2 ^c	ND ^a	ND ^a	0,5 ^b
42	29,67	biciclogermacreno	1511	1511	1,8 ^b	1,0 ^a	0,7 ^a	1,0 ^a
43	29,89	α-farneseno	1520	1519	4,9 ^c	2,3 ^b	ND ^a	2,4 ^b
44	29,95	α-bisaboleno	1523	1523	2,5 ^c	ND ^a	7,6 ^d	1,3 ^b
45	30,12	γ-cadineno	1530	1526	1,5 ^b	0,4 ^a	0,3 ^a	0,6 ^a
46	30,33	δ-cadineno	1538	1533	2,3 ^b	0,6 ^a	0,6 ^a	1,0 ^a
47	30,56	cadina-1,4-dieno	1547	1548	0,3 ^b	0,07 ^b	ND ^a	0,1 ^b
48	30,68	α-cadineno	1552	1556	0,5	0,1	0,3	0,2
49	30,83	α-calacoreno	1558	1560	0,2 ^b	0,1 ^b	ND ^a	0,1 ^b
50	31,32	δ-gurjuneno	1577	1571	0,1 ^b	0,04 ^b	ND ^a	0,1 ^b
51	31,48	N.I. *	1584	-	ND	ND	0,1	ND
52	31,99	N.I. *	1604	-	0,2	0,1	0,1	0,1
53	32,58	N.I. *	1629	-	0,2	0,1	0,1	0,1
54	33,62	N.I. *	1673	-	0,03	ND	0,06	0,03
% Área total					100,0	100,0	100,0	100,0
% Área total identificada					99,5	99,6	99,5	99,7
% Compuestos identificados					90,5	95,1	81,2	93,5

^a Tiempo de retención; ^b Identificado por GC-MS; ^c Índice de retención de Kovat's experimental; ^d Índice de retención de Kovat's de literatura; ^e Cuantificado por GC-FID, donde I = inflorescencias; H: hojas; T: tallos y PE: planta entera; letras distintas indican diferencias significativas del ANOVA con test Tukey (p<0,05) * Compuesto no identificado; ND: No Detectado.

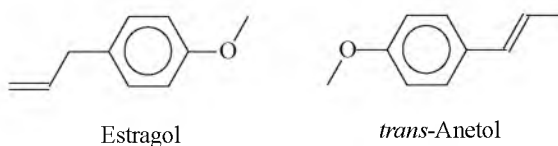


Figura 6.9. Componentes volátiles mayoritarios de *T. filifolia* Lag. ⁴

6.4.1- Comparación entre el análisis por HS-SPME y del aceite esencial

A partir del análisis de CVV de planta entera de *T. filifolia* por HS-SPME se encontraron 46 componentes diferentes en la fracción volátil de *T. filifolia*, 43 de los cuales fueron

⁴ Fuente de las estructuras químicas: Base de datos NIST: <http://webbook.nist.gov/chemistry/>

identificados (93,5 %), lo que corresponde al 99,7 % del área total observada en el cromatograma. Los principales componentes hallados fueron estragol y *trans*-anetol.

Comparando los resultados obtenidos para el análisis de aceite esencial reportado en la literatura (Aburrá *et al.*, 1990; Maestri *et al.*, 1993; Żygadło *et al.*, 1993; Marotti *et al.*, 2004; Serrato-Cruz *et al.*, 2008; Gleiser *et al.*, 2011; López *et al.*, 2011; Olmedo *et al.*, 2015) con los obtenidos por HS-SPME, los componentes mayoritarios de literatura fueron los mismos que los hallados en planta entera y en las mismas cantidades, *trans*-anetol (≈ 57 %) y estragol (≈ 22 %). Se hallaron diferencias en los componentes minoritarios con respecto al aceite esencial de *T. filifolia* de Perú (De Feo *et al.*, 1998), lo cual es concordante con estudios que demuestran que la composición y rendimiento del aceite esencial varía con la altura sobre el nivel del mar (Maestri *et al.*, 1991; Serrato-Cruz *et al.*, 2008), aunque también se halló variabilidad interpoblacional en especies de la misma región geográfica (Serrato-Cruz *et al.*, 2008). En este sentido, las variaciones podrían deberse a una respuesta adaptativa de las poblaciones a los diferentes hábitats en diferentes altitudes (Maestri *et al.*, 1991).

6.4.2- Diferencias entre la composición de inflorescencias, tallos y hojas

Estragol y *trans*-anetol fueron los componentes mayoritarios de hojas, tallos e inflorescencias, aunque en porcentajes diferentes (Tabla 6.3).

Comparando los resultados obtenidos en las diferentes partes aéreas de *T. filifolia*, se pueden observar mayores similitudes entre hojas e inflorescencias en cuanto a los compuestos minoritarios, aunque no se observaron grandes diferencias en los compuestos mayoritarios ni en el número de compuestos encontrados en cada parte de la planta. Algunas de las diferencias más importantes fueron:

- (a) Tanto las inflorescencias como las hojas resultaron responsables de la mayor cantidad de compuestos orgánicos volátiles (42 y 41 respectivamente), mientras que los tallos contribuyeron con un número menor (sólo 32 compuestos).
- (b) Los tallos fueron la principal fuente de α -cubebeno, isodieno, α -isocomeno, β -elemeno, β -cariofileno, y α -bisaboleno.
- (c) 1-Undeceno, duraldehído, β -maalieno y α -humuleno fueron compuestos de menor importancia presentes sólo en los tallos, mientras que *cis*-3-hexenol y γ -muuroleno fueron componentes exclusivos de las hojas, y α -muuroleno de las inflorescencias.

(d) Metil eugenol, α -copaeno, iso-longifoleno, aristoleno, *allo*-aromadendreno, α -elemeno, calareno, *epi*-biciclosesquifelandreno, α -amorfenol, germacreno D, α -zingibereno, α -farneseno, cadina-1,4-dieno, α -calacoreno y δ -gurjuneno se encontraron exclusivamente en inflorescencias y hojas.

(e) *Trans*- α -bergamoteno y α -bisaboleno se hallaron sólo en inflorescencias y tallos.

(f) Valenceno sólo se encontró en hojas y tallos.

Otros investigadores no hallaron grandes diferencias en la composición del aceite esencial de hojas (Zygadlo *et al.*, 1994) y flores (Zygadlo *et al.*, 1993), pero encontraron un número considerablemente menor de CVV.

6.5- Caracterización de compuestos volátiles en *Tagetes argentina*

Los CVV de *T. argentina* se caracterizaron por HS-SPME, y los resultados se resumen en la tabla 6.4. Las estructuras químicas de los CVV mayoritarios se muestran en la figura 6.10.

Tabla 6.4. Componentes volátiles hallados en *T. argentina* Cabrera por HS-SPME, usando una fibra DVB-CAR-PDMS 50/30 μ m; temperatura de extracción de 40 °C; 10 minutos de equilibrio del HS y 30 minutos de exposición de la fibra en el HS. Se muestran valores promedios de tres determinaciones, cuyos CV fueron menores al 5 %.

Pico	t _R ^a (min)	Compuesto ^b	% ^c					KI _e ^d	KI _r ^e
			I. ^f	H. ^g	T. ^h	P. E. ⁱ			
1	14,91	<i>p</i> -cimeno	ND ^a	0,8 ^b	ND ^a	ND ^a	1025	1025	
2	15,16	limoneno	0,5 ^b	0,6 ^b	ND ^a	0,9 ^b	1032	1033	
3	15,63	dihidrotagetona	5,2 ^b	2,8 ^a	29,6 ^d	6,4 ^c	1045	1047	
4	15,92	<i>cis</i> -β-ocimeno	ND ^a	ND ^a	0,3 ^b	ND ^a	1053	1054	
5	16,13	<i>trans</i> -β-ocimeno	3,0 ^b	0,6 ^a	3,3 ^b	2,6 ^b	1059	1058	
6	16,96	β-tuyona	0,3 ^b	ND ^a	ND ^a	ND ^a	1082	1081	
7	17,28	<i>iso</i> -terpinoleno	0,5 ^b	0,4 ^b	ND ^a	0,8 ^b	1091	1091	
8	17,38	α-piridona	0,6 ^{b,c}	0,3 ^b	ND ^a	0,8 ^c	1094	1094	
9	18,22	crisantenona	0,3 ^b	0,3 ^b	ND ^a	0,5 ^b	1119	1121	
10	18,71	<i>allo</i> -ocimeno	0,8 ^a	0,6 ^a	3,1 ^b	1,1 ^a	1134	1132	
11	19,23	<i>trans</i> -tagetona	8,8 ^b	7,7 ^a	7,9 ^a	11,8 ^c	1150	1149	
12	19,54	<i>cis</i> -tagetona	10,1 ^c	7,2 ^a	8,2 ^b	9,4 ^c	1159	1156	
13	19,94	<i>p</i> -cimen-8-ol	2,0 ^b	1,5 ^b	ND ^a	1,7 ^b	1172	1172	
14	20,06	N.I.*	ND	ND	ND	0,1	1176		
15	20,38	4-terpineol	ND ^a	10,1 ^c	ND ^a	0,1 ^b	1185	1182	
16	20,81	carvona	0,2 ^b	6,0 ^c	ND ^a	0,3 ^b	1198	1200	
17	21,24	verbenona	1,3 ^b	1,1 ^b	ND ^a	1,1 ^b	1213	1218	
18	21,34	N.I.*	0,1	ND	ND	0,1	1216		
19	22,00	<i>cis</i> -tagetenona	29,6 ^c	33,3 ^d	4,1 ^a	17,9 ^b	1238	1232	
20	22,46	<i>trans</i> -tagetenona	21,1 ^c	14,4 ^b	2,8 ^a	28,8 ^d	1253	1252	
21	22,77	N.I.*	0,1	ND	ND	0,1	1263		
22	22,91	anisol	1,1 ^c	0,4 ^b	ND ^a	0,7 ^{b,c}	1268	1265	
23	23,44	piperitona	1,6 ^b	1,3 ^b	ND ^a	1,3 ^b	1285	1282	

Tabla 6.4. Continuación.

Pico	tr ^a (min)	Compuesto ^b	% ^c		T. ^h	P. E. ⁱ	KI _e ^d	KI _r ^e
			I. ^f	H. ^g				
24	23,71	N.I. *	ND	0,1	ND	ND	1294	
25	24,74	N.I. *	0,2	ND	ND	0,1	1328	
26	25,16	metil eugenol	0,4	0,2	0,7	0,5	1345	1348
27	25,38	δ-elemeno	0,4 ^a	0,2 ^a	1,6 ^b	0,4 ^a	1352	1353
28	25,80	cis-carvona óxido	ND ^a	0,8 ^b	ND ^a	ND ^a	1367	1366
29	26,27	N.I. *	0,1	ND	0,3	0,1	1384	
30	26,47	N.I. *	0,3	ND	0,4	0,1	1391	
31	26,77	β-longipineno	0,6 ^b	0,4 ^b	ND ^a	0,6 ^b	1402	1403
32	27,56	β-cariofileno	2,1 ^b	0,5 ^a	13,5 ^c	2,3 ^b	1432	1430
33	27,75	N.I. *	0,2	ND	0,3	0,1	1439	
34	27,94	N.I. *	0,1	ND	ND	0,1	1446	
35	28,07	aromadendreno	1,1 ^a	1,5 ^{a,b}	2,4 ^b	1,0 ^a	1451	1452
36	28,15	N.I. *	ND	ND	ND	0,1	1454	
37	28,46	calareno	0,9 ^b	ND ^a	5,6 ^c	1,0 ^b	1465	1467
38	29,04	α-amorfeno	0,3	0,9	0,8	0,3	1484	1485
39	29,03	N.I. *	ND	0,2	ND	ND	1487	
40	29,11	N.I. *	ND	0,1	ND	ND	1490	
41	29,22	germacreno D	2,4 ^b	1,2 ^a	4,5 ^c	2,5 ^b	1494	1492
42	29,38	trans-α-farneseno	0,1 ^b	0,6 ^c	ND ^a	0,1 ^b	1499	1500
43	29,63	biciclogermacreno	2,9 ^b	1,2 ^a	5,4 ^c	3,0 ^b	1510	1511
44	29,80	β-cadineno	0,1 ^b	ND ^a	ND ^a	0,1 ^b	1517	1520
45	30,01	γ-cadineno	0,3 ^a	0,4 ^{a,b}	0,9 ^b	0,2 ^a	1525	1525
46	30,22	δ-cadineno	0,5 ^a	0,5 ^a	1,8 ^b	0,6 ^a	1533	1533
47	30,59	spatulanol	0,1 ^b	ND ^a	0,4 ^b	0,1 ^b	1548	1549
48	30,99	germacreno B	ND ^a	0,2 ^b	ND ^a	ND ^a	1564	1563
49	31,77	guaíol	ND ^a	0,5 ^b	ND ^a	ND ^a	1595	1598
50	35,78	ácido tetradecanoico	ND ^a	ND ^a	0,4 ^b	ND ^a	1767	1765
51	37,43	neofitadieno	0,2 ^a	0,3 ^a	0,9 ^b	0,3 ^a	1839	1837
52	38,42	N.I. *	ND	0,1	ND	ND	1881	
53	40,85	N.I. *	ND	0,9	0,9	ND	1968	
Total			100,0	100,0	100,0	100,0		
% Compuestos Identificados			82,1	86,8	84,0	78,0		
% Área Identificada			99,5	99,7	99,0	99,1		

^a Tiempo de retención; ^b Identificados por GC-MS; ^c Cuantificados por GC-FID, letras distintas indican diferencias significativas del ANOVA con test Tukey (p<0,05); ^d Índices de retención de Kovat's experimentales; ^e Índices de retención de Kovat's de literatura; ^f Inflorescencias; ^g Hojas; ^h Tallos; ⁱ Planta Entera; * Compuesto no identificado; ND: No Detectado.

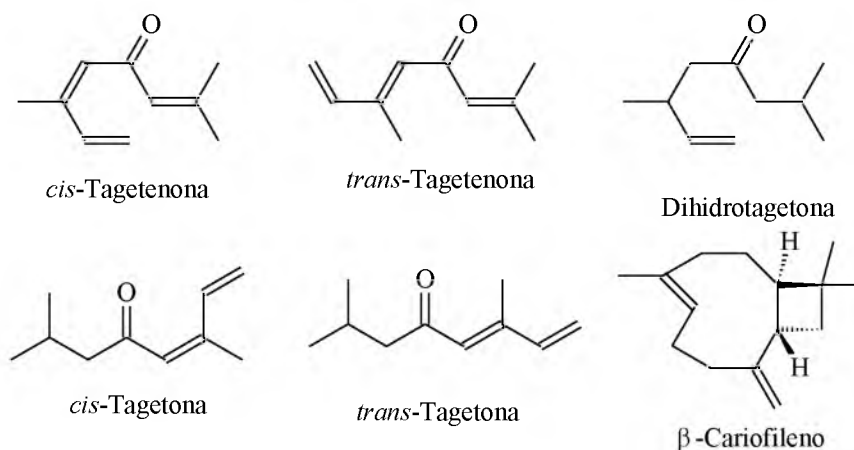


Figura 6.10. Componentes volátiles mayoritarios de *T. argentina* Cabrera. ⁵

⁵ Fuente de las estructuras químicas: Base de datos NIST: <http://webbook.nist.gov/chemistry/>

6.5.1- *Comparación entre el análisis por HS-SPME y del aceite esencial*

A partir del análisis de CVV de planta entera de *T. argentina* por HS-SPME se encontraron 41 componentes diferentes, 32 de los cuales fueron identificados (78,0 %), lográndose la identificación positiva del 99,1 % del área total del cromatograma. Los componentes mayoritarios fueron *cis*-tagetenona y *trans*-tagetenona (Tabla 6.4).

Comparando los resultados obtenidos para el análisis de aceite esencial reportado en la literatura (Zygadlo *et al.*, 1993) y los obtenidos por HS-SPME, los componentes mayoritarios resultaron ser los mismos. Sin embargo, el análisis por HS-SPME permitió identificar un mayor número de CVV.

6.5.2- *Diferencias entre la composición de inflorescencias, tallos y hojas*

Cis-tagetenona y *trans*-tagetenona fueron los componentes mayoritarios de hojas e inflorescencias, aunque en cantidades diferentes, mientras que en tallos lo fueron dihidrotagetona y β -cariofileno (Tabla 6.4).

Comparando los resultados obtenidos en las diferentes partes aéreas de *T. argentina*, se pueden observar mayores similitudes entre hojas e inflorescencias en cuanto a los compuestos mayoritarios y minoritarios, aunque también se observaron diferencias en el número de compuestos producidos por cada parte de la planta. Algunas de las diferencias y similitudes más importantes fueron:

- (a) Las inflorescencias y las hojas son responsables de la mayor cantidad de la emisión de CVV (39 y 38 respectivamente) en comparación con los tallos que producen un número menor (sólo 25 compuestos).
- (b) *Cis* y *trans*-tagetona se encontraron aproximadamente en las mismas concentraciones en inflorescencias, tallos y hojas.
- (c) β -Tuyona, β -cadineno y neofitadieno fueron compuestos presentes sólo en inflorescencias.
- (d) *p*-Cimeno, 4-terpineol, *cis*-carvona, germancreno B y guaiol fueron componentes exclusivos de las hojas.
- (e) *Cis*- β -ocimeno sólo se observó en los tallos.

No se encontraron estudios previos de la composición de diferentes partes aéreas de *T. argentina*.

6.6- Comparación de la composición de volátiles en las tres especies del género *Tagetes*

Comparando la composición de CVV hallados en las tres especies de *Tagetes* estudiadas por HS-SPME de las partes aéreas combinadas, se pueden observar algunas similitudes y diferencias interesantes:

- (a) De los 72 CVV identificados, sólo 10 de ellos se encontraron en las tres especies, aunque en cantidades diferentes, los cuales se encontraron en concentraciones menores al 5 %: metil eugenol, δ -elemeno, β -cariofileno, aromadendreno, calareno, α -amorfeno, germacreno D, biciclogermacreno, γ -cadineno y δ -cadineno.
- (b) Los componentes principales de *T. argentina* y *T. minuta* (*cis* y *trans* tagetenona) son los mismos, aunque en cantidades diferentes.
- (c) Los componentes principales de *T. filifolia* (estragol y *trans*-anetol) no se encuentran en las otras dos especies o lo hacen en muy pequeña proporción.
- (d) De los 72 CVV identificados, 16 se encontraron en *T. argentina* y *T. minuta* y no en *T. filifolia*, aunque en cantidades diferentes: limoneno, dihidrotagetona, *trans*- β -ocimeno, α -piridona, crisantenona, *allo*-ocimeno, *cis* y *trans* tagetona, p-cimen-8-ol, carvona, verbenona, *cis* y *trans* tagetenona, anisol, piperitona y β -longipineno.
- (e) De los 72 CVV identificados, 4 se encontraron en *T. filifolia* y *T. minuta* y no en *T. argentina*, aunque en concentraciones diferentes: *trans*-anetol, eugenol, α -cubebeno y α -copaeno.

La presencia en *T. filifolia* de grandes cantidades de compuestos de fenilpropanoides (estragol y anetol), sugiere que el proceso biosintético principal es el que se origina a partir del aminoácido aromático FA, mientras que los componentes terpénicos hallados en *T. minuta* y *T. argentina* implican que el proceso biosintético principal es el de terpenoides vía MEP (Capítulo 1) (Marotti *et al.*, 2004).

Capítulo 7

Caracterización de compuestos volátiles en especies del género *Lantana* (Verbenaceae)

-
- 7.1- Introducción.
 - 7.2- Optimización del muestreo por HS-SPME.
 - 7.2.1- Selección del tipo de fibra SPME.
 - 7.2.2- Selección de la temperatura de trabajo.
 - 7.2.3- Selección del tiempo de equilibrado del HS.
 - 7.2.4- Selección del tiempo de exposición de la fibra en el HS.
 - 7.3- Caracterización de compuestos volátiles en *Lantana balansae*.
 - 7.3.1- Comparación entre el análisis por HS-SPME y del aceite esencial.
 - 7.3.2- Diferencias entre la composición de inflorescencias, tallos y hojas.
 - 7.4- Caracterización de compuestos volátiles en *Lantana grisebachii*.
 - 7.4.1- Comparación entre el análisis por HS-SPME y del aceite esencial.
 - 7.4.2- Diferencias entre la composición de inflorescencias, tallos y hojas.
 - 7.5- Caracterización de compuestos volátiles en *Lantana camara* provenientes de especímenes con flores de colores diferentes.
 - 7.5.1- *L. camara* de flores de color rosa y amarillo.
 - 7.5.1.1- Comparación entre el análisis por HS-SPME y del aceite esencial.
 - 7.5.1.2- Diferencias entre la composición de inflorescencias, tallos y hojas.
 - 7.5.2- *L. camara* de flores de color naranja y amarillo.
 - 7.5.2.1- Comparación entre el análisis por HS-SPME y del aceite esencial.
 - 7.5.2.2- Diferencias entre la composición de inflorescencias, tallos y hojas.
 - 7.5.3- *L. camara* de flores de color amarillo.
 - 7.5.3.1- Comparación entre el análisis por HS-SPME y del aceite esencial.
 - 7.5.3.2- Diferencias entre la composición de inflorescencias, tallos y hojas.
 - 7.5.4- *L. camara* de flores de color blanco.
 - 7.5.4.1- Comparación entre el análisis por HS-SPME y del aceite esencial.
 - 7.5.4.2- Diferencias entre la composición de inflorescencias, tallos y hojas.
 - 7.6- Comparación de la composición de volátiles en las especies de *Lantana* estudiadas.
-

7.1- Introducción

La familia Verbenaceae comprende cien géneros y unas 2600 especies distribuidas en regiones tropicales y subtropicales de todo el mundo (Sousa & Costa, 2012). Muchos géneros pertenecientes a esta familia poseen varias propiedades biológicas y farmacológicas, entre las cuales se encuentra el género *Lantana* (Sousa & Costa, 2012).

El género *Lantana* fue descrito por Linnaeus en 1753 y contenía, en sus inicios, siete especies, seis de América del Sur y una de Etiopía (Munir, 1996). El término *Lantana* proviene probablemente del antiguo nombre latino del género, *Viburnum*, que se relaciona con la

morfología de las hojas y las inflorescencias (Hussain *et al.*, 2011; Sousa & Costa, 2012). Taxonómicamente, este género es difícil de clasificar ya que las especies no son estables, la hibridación es muy común, la forma de la inflorescencia cambia con la edad, y los colores de las flores varían con la edad y la madurez (Munir, 1996; Hussain *et al.*, 2011; Sousa & Costa, 2012). Debido a estas características, las especies de *Lantana* se han estudiado mucho con respecto a la citogenética dentro de la familia Verbenaceae (Sousa & Costa, 2012).

Actualmente, el género *Lantana* se compone de aproximadamente 150 especies, que se extienden geográficamente desde los trópicos hasta las zonas subtropicales de América, con algunos miembros encontrados en Asia tropical y África (Ghisalberti, 2000; Sena Filho *et al.*, 2012). Taxonómicamente, el género *Lantana* se divide en cuatro secciones: *Lantana*, *Calliorea*, *Rhytidocamara* y *Sarcolippia* (Sena Filho *et al.*, 2012). Las divisiones se basan en características florales y carpológicas siendo éstas, las mejores herramientas de clasificación disponibles en el momento en el que se hicieron. Debido a la dificultad para su clasificación por lo que se dijo anteriormente, se realizan importantes esfuerzos para fundamentarla en aspectos fitoquímicos (Sena Filho *et al.*, 2012). En este sentido, un estudio taxonómico de cuatro géneros de la familia Verbenaceae (*Lippia*, *Lantana*, *Aloysia* y *Phyla*) propuso el uso de los glucósidos iridoides como un marcador taxonómico para esta familia (Rimpler & Sauerbier, 1986), el cual aportó una gran cantidad de información sobre la quimiotaxonomía de Verbenaceae. Desafortunadamente, la presencia y el tipo de glucósidos iridoides en plantas de los géneros *Lippia* y *Lantana* morfológicamente similares, son prácticamente indistinguibles, por lo que no son muy útiles para diferenciarlos. Sena Filho *et al.* (2010) propusieron utilizar marcadores químicos hallados en el aceite esencial de las hojas para diferenciarlos, siendo para el género *Lantana*, β -cariofileno el compuesto principal detectado, junto con β -felandreno, β -cubebeno y elixeno como componentes menores, mientras que en el caso de una especie del género *Lippia* evaluada, los compuestos principales fueron limoneno, citral, carvacrol, β -mirceno, alcanfor y timol.

Muchos estudios han descrito la composición química de extractos y aceites esenciales, además de la actividad farmacológica de una variedad de especies de *Lantana* de diversas regiones geográficas (Jiménez-Arellanes *et al.*, 2003; Julião *et al.*, 2009; de Sena Filho *et al.*, 2009; Silva *et al.*, 2010; Sousa *et al.*, 2010, 2012; Hussain *et al.*, 2011; Sousa & Costa, 2012). Una característica importante de las especies de este género es que son plantas prácticamente inmunes al ataque de herbívoros, debido a la presencia de una gran diversidad de metabolitos secundarios (Kohli *et al.*, 2006). Las especies de *Lantana* tienen un olor muy picante que se origina principalmente en sus hojas (Ghisalberti, 2000; Walden *et al.*, 2009; Sena Filho *et al.*,

2012). Se las utiliza principalmente para la ornamentación en jardines (Chowdhury *et al.*, 2007) y en medicina popular. Algunas especies también se utilizan en el control biológico como plaguicidas (Ghisalberti, 2000; Dua *et al.*, 2010). Los extractos orgánicos y los AE de *Lantana* han mostrado una gran variedad de actividades biológicas y farmacológicas (Sousa & Costa, 2012).

Lantana camara L. (Figura 7.1), conocida en Argentina como *camará* o *camará de dos colores* (Barboza *et al.*, 2006), es nativa de América tropical y subtropical. Los exploradores holandeses la llevaron desde Brasil hacia los Países Bajos hacia finales del siglo VII, y luego, a Europa, Gran Bretaña y Norteamérica (Hussain *et al.*, 2011). Después de su introducción en Hawai con fines ornamentales, pronto se extendió a las islas del Pacífico, Australia y el sur de Asia (Hussain *et al.*, 2011). De manera similar, desde Brasil, se propagó rápidamente a las zonas más cálidas de Sudáfrica por las aves migratorias (Hussain *et al.*, 2011). En los siglos XVIII y XIX, se comercializaron y popularizaron muchas formas coloridas de *Lantana camara*, y ahora se cultiva en todo el mundo como planta ornamental debido a que sus flores pueden tener colores diferentes dependiendo de la variedad, (rosa, naranja, amarillo, blanco) (Sonibare & Effiong, 2008; Hussain *et al.*, 2011).



Figura 7.1. *Lantana camara* L. ¹

La planta es una maleza agresiva que ha invadido grandes extensiones de pastos, huertos y áreas forestales en muchas regiones tropicales y subtropicales. Se ha estimado que ha invadido 4 millones de hectáreas en Australia (Munir, 1996; Ross, 1999) y 160.000 en Hawai (Ross, 1999). Aparte de su popularidad como planta de jardín, *L. camara* forma un cerco útil, y proporciona una buena preparación para cultivos, cubriendo el suelo de hojas finas que

¹ Fuente <http://www.kumarannurserygarden.com/category/ornamental-shrubs/page/6/index.html>

mejoran la fertilidad de los suelos rocosos, enriquece la tierra, retiene el *humus* en las áreas deforestadas y controla la erosión del suelo (Munir, 1996; Hussain *et al.*, 2011). Puede proteger las plántulas de sándalo de parásitos (Hussain *et al.*, 2011), y en las islas del Pacífico se ha utilizado como soporte para algunas vides (Hussain *et al.*, 2011). Las hojas y tallos de *Lantana* se usan a menudo en la India como mantillo verde (Hussain *et al.*, 2011). Su ceniza es rica en potasio y manganeso, que es útil como abono de los árboles de coco (Hussain *et al.*, 2011). La planta no sirve para alimentar al ganado a menos que el pasto sea muy escaso. En los países tropicales, se comen las bayas maduras de color azul-negro, pero la ingestión de la baya verde ha dado lugar a muertes tanto de humanos como de animales (Morton, 1994; Ross 1999; Hussain *et al.*, 2011).

Hay evidencia de que *L. camara* tiene actividad biológica contra un amplio espectro de bacterias (Barre *et al.*, 1997; Saleh *et al.*, 1999; Sonibare & Effiong, 2008; Costa *et al.*, 2009; Sousa *et al.*, 2010, 2011), hongos (Saksena & Tripathi, 1985; Sonibare & Effiong, 2008), parásitos (Ali *et al.*, 2001; Clarkson *et al.*, 2004; Misra *et al.*, 2007; Begum *et al.*, 2008; Valadeu *et al.*, 2009) y una gran variedad de insectos (Saxena *et al.*, 1992; Bouda *et al.*, 2001; Iannacone, 2003; Abdel-Hady *et al.*, 2005; Kathuria & Kaushik, 2006; Verma & Verma, 2006; Kumar & Maneemegalai, 2008; Suman & Mehta, 2009a, 2009b; Costa *et al.*, 2010; Dua *et al.*, 2010), a las que se suma su acción repelente contra algunos insectos (Deka *et al.*, 1998; Dong *et al.*, 2005; Fracknath, 2006). Además, se reportó su actividad citotóxica (Fatope *et al.*, 2002; Sonibare & Effiong, 2008; Costa *et al.*, 2009), alelopática (Kong *et al.*, 2006; Saulo *et al.*, 2009; Verdeguer *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2009), antioxidante (Benites *et al.*, 2009; Bhakta & Ganjewala, 2009), antiinflamatoria (Oyedapo *et al.*, 1999; Benites *et al.*, 2009; Ghosh *et al.*, 2010), antitumoral (Herbert *et al.*, 1991; Jonville *et al.*, 2008; Sharma *et al.*, 2008; Litaudon *et al.*, 2009; Gupta *et al.*, 2010; Srivastava *et al.*, 2010), anticoceptiva (Mello *et al.*, 2003, 2005), anticoagulante (O'Neill *et al.*, 1998), antimutagénica (Barre *et al.*, 1997), antiulcerogénica (Sathish *et al.*, 2011), antimotilidad intestinal (Sagar *et al.*, 2005), antihiper glucémica (Sen, 2016), hipoglucemiante (Venkatachalam *et al.*, 2011), cicatrizante de heridas (Nayak *et al.*, 2009) y antiurolitiásica (Mayee & Thosar, 2011). Adicionalmente, se estudió su toxicidad *in vivo* (Sharma *et al.*, 1987; Sharma *et al.*, 1989; Sharma *et al.*, 1992; Tokarnia *et al.*, 1999), la cual es debida a la sensibilidad de algunos animales a la presencia de lantadenos A, B y D, siendo la fotosensibilización e ictericia los signos clínicos preponderantes de envenenamiento (Kalita *et al.*, 2012).

En medicina popular, *L. camara* ha sido utilizada en India para tratar la tos, enfermedades mentales, forúnculos, tuberculosis, malaria, viruela, tétanos, fiebre y tumores (Rahmatullah *et*

al., 2011). También es utilizada como antihelmíntica, diurética, antiespasmódica y para el tratamiento de enfermedades intestinales y del estómago (Rahmatullah *et al.*, 2011). Adicionalmente se utiliza como antiencefálico, dermatopático, emenagogo, antidontálgico, béquico, digestivo, antirreumático (Ghisalberti, 2000; Barboza *et al.*, 2006), antiasmático, antiulceroso, vermífugo, cardiotónico, antiespasmódico y anihipertensivo (Ghisalberti, 2000). Las decocciones se utilizan externamente para tratamiento de la lepra y la sarna (Ghisalberti, 2000).

Lantana balansae Briquet (Figura 7.2) es un arbusto perenne con olor muy picante y pequeñas flores rosado lilacinas, conocido en Argentina como *lantana de las sierras* (Barboza *et al.*, 2006). Habita en el nordeste y centro de Argentina, siendo muy frecuente en Córdoba (Barboza *et al.*, 2006). Se han reportado evidencias de su actividad biológica contra un amplio espectro de bacterias (Salvat *et al.*, 2004; Wei *et al.*, 2008) y parásitos (Maldonado *et al.*, 2016). En medicina popular se usa como febrífugo (Barboza *et al.*, 2006; Goleniowski *et al.*, 2006), abortivo, emenagogo y laxante (Barboza *et al.*, 2006). En Bolivia, la infusión de hojas frescas se utiliza tradicionalmente para aliviar trastornos digestivos y espasmos musculares (Maldonado *et al.*, 2016).

Lantana grisebachii Seckt (Figura 7.3), conocida en Argentina como *palo de ángel* o *lantana* (Barboza *et al.*, 2006), es un arbusto de hasta 1 m de altura con flores de corola blanca con garganta amarilla (Barboza *et al.*, 2006). Se ha investigado su actividad biológica contra hongos (Díaz Napal *et al.*, 2015), bacterias (Palacios *et al.*, 2007), virus (García *et al.*, 2010, Sousa & Costa, 2012; Frederico *et al.*, 2017) y contra insectos (Palacios *et al.*, 2007). Adicionalmente, también se ha demostrado también que posee actividad antioxidante (Borneo *et al.*, 2009; Soria *et al.*, 2014; Canalis *et al.*, 2014; Cittadini *et al.*, 2015), con efecto protector contra la intoxicación con arsénico *in vitro* (Soria *et al.*, 2014; Bhattacharya, 2017) e *in vivo* (Soria *et al.*, 2008). Además, se investigó su efecto inhibidor de acetilcolinesterasa (Carpinella *et al.*, 2010). En medicina tradicional se utiliza como febrífugo (Barboza *et al.*, 2006; Palacios *et al.*, 2007; Borneo *et al.*, 2009), emético (Borneo *et al.*, 2009), sedante en niños (Martínez & Cúneo, 2009), estimulante gastrointestinal, antipirético (Soria *et al.*, 2014) y antimicrobiano (Barboza *et al.*, 2009).



Figura 7.2. *Lantana balansae* Briq. (Zuloaga *et al.* 2008).



Figura 7.3. *Lantana grisebachii* Seckt. (Rotman *et al.* 1999).

En este capítulo se describe la optimización de una técnica de HS-SPME en cuanto a tipos de fibras, temperatura de extracción, tiempo de equilibrio y tiempo de extracción, para la

posterior caracterización de CVV en *L. camara*, *L. balansae* y *L. grisebachii*. Además, se determina la composición de CVV por análisis de sus AE.

7.2- Optimización del muestreo por HS-SPME

7.2.1- Selección del tipo de fibra SPME

La figura 7.4 muestra el efecto del tipo de fibra sobre el área total de picos y sobre el área de los picos de algunos componentes de *L. camara*. El orden de eficiencia de extracción de CVV determinada a partir del área total fue: DVB-CAR-PDMS \geq CAR-PDMS > PDMS-DVB > PA \geq PDMS, siendo las fibras DVB-CAR-PDMS y CAR-PDMS las que mostraron una extracción más eficiente que el resto de las fibras estudiadas. Cuando se realizó el análisis de varianza (ANOVA) con test de Tukey para las áreas totales (Tabla 7.1), no hubo diferencias significativas entre las fibras DVB-CAR-PDMS y CAR-PDMS, ni entre las fibras PA y PDMS, pero si entre el primer grupo, el segundo y la fibra PDMS-DVB ($p < 0,05$). Por lo tanto, las fibras DVB-CAR-PDMS y CAR-PDMS mostraron similar afinidad por los componentes volátiles de *L. camara*.

Se observaron diferencias en la extracción de algunos de los componentes principales. Si bien las diferencias en el área total de CVV extraídos con las fibras CAR-PDMS y DVB-CAR-PDMS no fueron significativas, se observaron diferencias en las cantidades extraídas de los CVV mayoritarios. Mientras que con la fibra DVB-CAR-PDMS el orden de extracción fue hexen-3-ol > β -cariofileno > 1-octen-3-ol, en el caso de la fibra CAR-PDMS fue 1-octen-3-ol > β -cariofileno > hexen-3-ol. En todas las fibras excepto CAR-PDMS, el compuesto extraído en mayor proporción fue hexen-3-ol. Es notable observar el perfil de volátiles extraídos con la fibra PA, ya que muestra una gran afinidad por hexen-3-ol, siendo el CVV extraído en mayor proporción, aunque el resto de los volátiles fueron extraídos muy pobremente, probablemente por el carácter más polar de este recubrimiento (Pawliszyn, 2012). Los CVV más absorbidos con la fibra PDMS (sorbente líquido apolar), fueron hexen-3-ol, β -cariofileno y *ar*-curcumeno, mostrando una baja afinidad por 1-octen-3-ol en comparación con los demás recubrimientos.

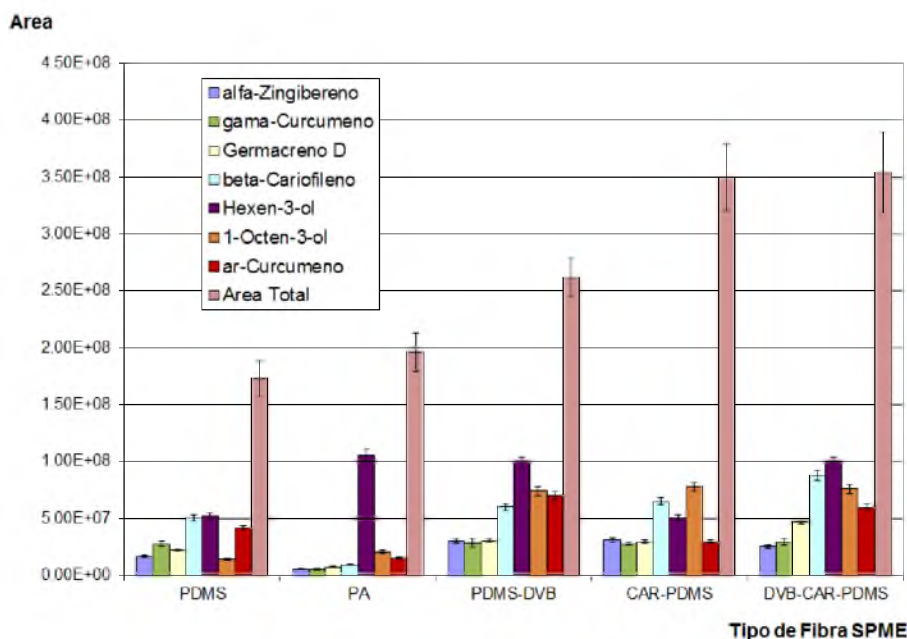


Figura 7.4. Efecto del tipo de fibra sobre el proceso de microextracción de componentes volátiles de *L. camara*.

La mayor extracción mostrada por las fibras que contienen una combinación de materiales sorbentes líquidos (PDMS) y sólidos (DVB y CAR) en comparación con las otras fibras evaluadas, muestra que ellas permiten la extracción de volátiles de un amplio rango de pesos moleculares y polaridad, lo que conduce a una sorción equilibrada de compuestos volátiles y semivolátiles (Bianchin *et al.*, 2012; Pawliszyn, 2012).

Debido a que no hubo diferencias significativas en la extracción de volátiles por las fibras DVB-CAR-PDMS y CAR-PDMS (Tabla 7.1), se seleccionó la fibra DVB-CAR-PDMS para los análisis sucesivos. Además, la fibra CAR-PDMS mostró una baja eficiencia en la extracción de hexen-3-ol, que es un CVV presente en cantidades importantes en el AE de *L. camara* (Tabla 7.4), razón por la cual la composición de CVV obtenida con este recubrimiento podría no ser representativa de las plantas estudiadas (Wercinski, 1999; Pawliszyn, 2012).

7.2.2- Selección de la temperatura de trabajo

La figura 7.5 muestra el efecto de la temperatura de microextracción sobre el área total de picos y sobre el área de los picos de los algunos componentes de *L. camara*. El aumento de temperatura incrementa el área total de picos hasta los 40 °C, temperatura a partir de la cual se

mantiene aproximadamente constante. Sin embargo, la temperatura ejerce un efecto diferente en cada CVV particular. En el caso de hexen-3-ol el área aumenta hasta los 40 °C, temperatura a partir de la cual se mantiene aproximadamente constante, mientras que el resto de los CVV disminuye a partir de los 35-40 °C. Estas diferencias pueden estar relacionadas con el efecto de la temperatura sobre sus coeficientes de distribución entre el HS y la fibra, que, como se vio en el Capítulo 3, hay casos en los que aumentan y otros en los que disminuyen con la temperatura, dependiendo de sus puntos de ebullición (Wercinski, 1999; Pawliszyn, 2012). Cuando se realizó un ANOVA sobre las áreas totales a las distintas temperaturas (Tabla 7.1), no se observaron diferencias significativas entre las temperaturas por encima de 40 °C, ni entre las áreas a 25 y 30 °C, pero si entre ambos grupos y con el área a 35 °C. Por lo tanto, se seleccionó la temperatura de 40 °C como la menor temperatura posible que logra una buena eficiencia de extracción (Kolb & Ettre, 2006; Pawliszyn, 2012).

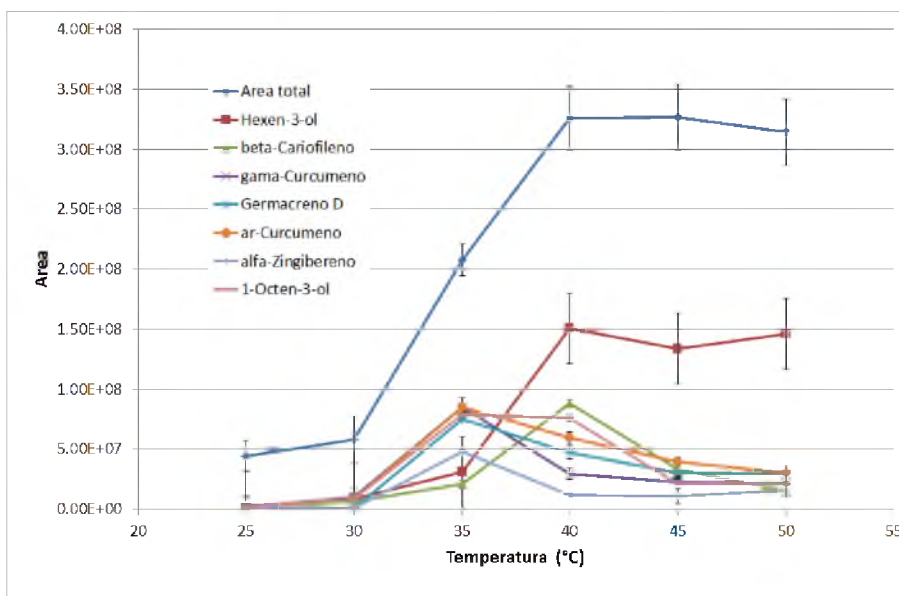


Figura 7.5. Efecto de la temperatura sobre el proceso de microextracción de componentes volátiles de *L. camara*.

7.2.3- Selección del tiempo de equilibrado del HS

La figura 7.6 muestra el efecto del tiempo de equilibrado del HS sobre el área total de picos de los cromatogramas y sobre el área de algunos CVV de *L. camara*. El incremento en el tiempo de equilibrio del HS provoca un aumento del área total y del área de los componentes principales de los cromatogramas hasta los 5 minutos, tiempo a partir del cual los parámetros permanecen relativamente constantes. El comportamiento de cada CVV en particular fue similar al área total, sin variación significativa. Cuando se realizó un análisis de varianza

(Tabla 7.1), no hubo diferencias significativas en los diferentes tiempos estudiados, razón por la cual se optó por equilibrar el HS durante 10 minutos. Resultados similares se obtuvieron en otros estudios de optimización, con tiempos óptimos de 10 min de equilibrado del HS o incluso menores (Ma *et al.*, 2013).

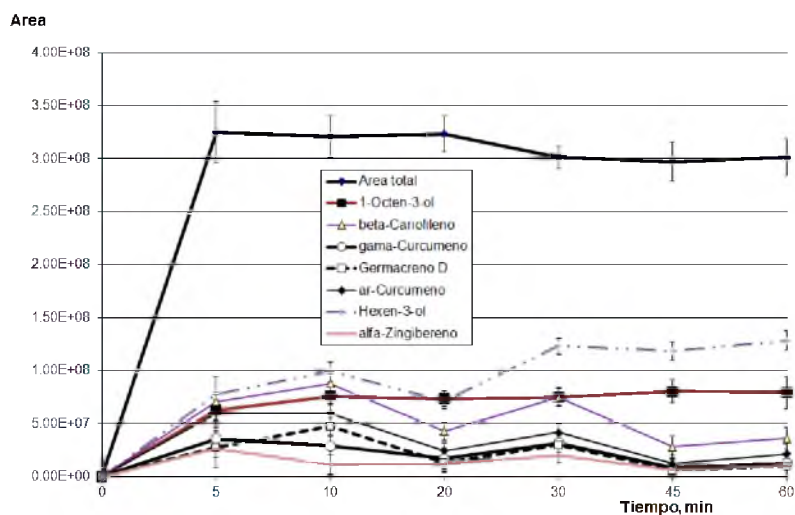


Figura 7.6. Efecto del tiempo de equilibrado del HS sobre el proceso de microextracción de componentes volátiles de *L. camara*.

7.2.4- Selección del tiempo de exposición de la fibra en el HS

La figura 7.7 muestra el efecto del tiempo de exposición de la fibra en el HS sobre el proceso de microextracción. Se puede observar que, al aumentar el tiempo de exposición, aumenta el área total de picos de cromatograma. Lo mismo sucede con las áreas correspondientes a 1-octen-3-ol, β-cariofileno, germacreno D y ar-curcumeno, sin embargo, no se observa una gran influencia del tiempo de exposición sobre las áreas de los demás componentes de *L. camara*. Cuando se realizó un análisis de varianza, no hubo diferencias significativas de las áreas entre los 10 y 45 minutos, así como tampoco entre las áreas a los 5, 10 y 20 minutos. El área total a los 60 minutos fue la mayor y significativamente diferente del resto (Tabla 7.1). Por todo lo anterior, se seleccionó un tiempo de extracción de 60 min.

En la tabla 7.1 se muestran los valores de las áreas totales obtenidas con sus respectivas desviaciones estándares y los resultados del test Tukey ($p < 0,05$) del ANOVA sobre los datos de la optimización de las condiciones experimentales para el análisis de especies del género *Lantana*.

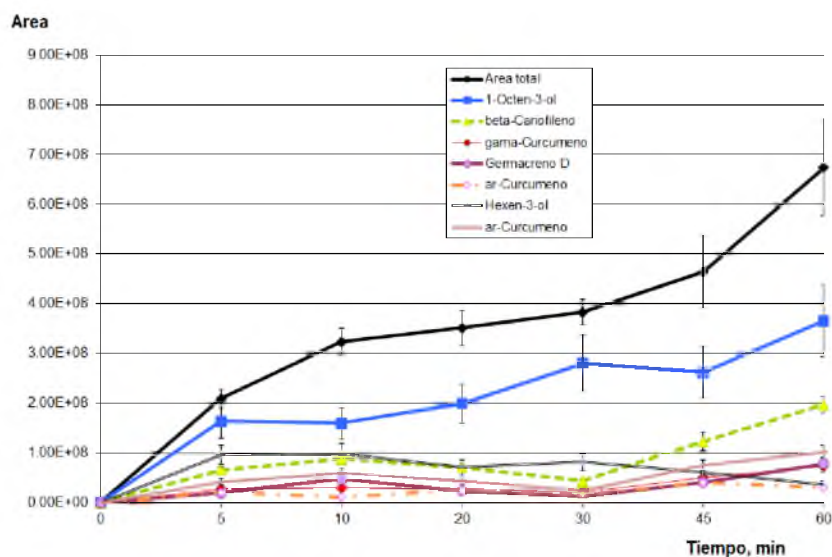


Figura 7.7. Efecto del tiempo de exposición de la fibra en el HS sobre el proceso de microextracción de componentes volátiles de *L. camara*.

Tabla 7.1. Optimización de las condiciones experimentales para el análisis de especies del género *Lantana spp.*

Variable	Categoría	Área total	SD ¹	Test Tukey ²
Tipo de fibra	PDMS	1,73E+08	1,5E+07	A
	PA	1,96E+08	1,7E+07	A
	PDMS-DVB	2,62E+08	1,7E+07	B
	CAR-PDMS	3,50E+08	2,9E+07	C
	DVB-CAR-PDMS	3,54E+08	3,6E+07	C
Temperatura (°C)	25	4,39E+07	1,3E+07	A
	30	5,80E+07	1,9E+07	A
	35	2,08E+08	1,3E+07	B
	40	3,26E+08	2,7E+07	C
	45	3,26E+08	2,8E+07	C
	50	3,14E+08	2,7E+07	C
Tiempo de equilibrado del HS (min)	5	3,25E+08	2,9E+07	A
	10	3,21E+08	2,0E+07	A
	20	3,23E+08	1,7E+07	A
	30	3,01E+08	1,0E+07	A
	45	2,97E+08	1,8E+07	A
	60	3,02E+08	1,8E+07	A
Tiempo de exposición de la fibra (min)	5	2,09E+08	1,9E+07	A
	10	3,23E+08	2,7E+07	A, B
	20	3,51E+08	3,6E+07	A, B
	30	3,83E+08	2,5E+07	B
	45	4,64E+08	7,2E+07	B
	60	1,07E+09	9,6E+07	C

¹ Desviación estándar de determinaciones por triplicado.

² Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

A partir de los resultados de optimización, las condiciones adoptadas para análisis de especies de *Lantana* son: fibra extractante: DVB-CAR-PDMS; temperatura de extracción: 40 °C; 10 minutos de equilibrio del HS y 60 minutos de exposición de la fibra en el HS.

7.3- Caracterización de compuestos volátiles en *Lantana balansae*

Se determinaron los CVV en muestras de parte aérea de *L. balansae* por las técnicas de hidrodestilación y HS-SPME. Los resultados se utilizaron para compararlos entre sí y con los obtenidos a partir de las demás especies de *Lantana* estudiadas. Por otro lado, también se analizaron por HS-SPME las partes aéreas por separado (hojas, inflorescencias y tallos), con la finalidad de determinar similitudes y diferencias en la producción de CVV. Los resultados se resumen en la tabla 7.2, y las estructuras químicas de algunos de los componentes volátiles hallados en mayor proporción se muestran en la figura 7.8.

Tabla 7.2. Componentes volátiles hallados en *L. balansae* por análisis del aceite esencial y HS-SPME, usando una fibra DVB-CAR-PDMS 50/30 µm; temperatura de extracción de 40 °C; 10 minutos de equilibrio del HS y 60 minutos de exposición de la fibra en el HS. Se muestran valores promedios de tres determinaciones, cuyos coeficientes de variación fueron menores al 5 %.

Pico	tr ^a (min)	Compuesto ^b	H ^f	T ^g	% ^c I ^h	P. E. ⁱ	A. E. ^j	KI ^e ^d	KI ^e
1	11,28	α-pineno	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	1,0 ^b	948	948
2	11,86	canfeno	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	2,7 ^b	960	960
3	12,86	β-pineno	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	0,3 ^b	981	980
4	12,94	sabineno	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	0,2 ^b	983	987
5	13,87	β-mirceno*	0,4 ^{a,b}	0,9 ^b	0,1 ^a	0,4 ^{a,b}	4,0 ^c	1003	995
6	14,50	α-felandreno	0,4 ^{b,c}	ND ^a	ND ^a	0,1 ^b	0,8 ^c	1007	1013
7	15,21	limoneno	1,1 ^b	5,4 ^c	0,6 ^a	0,5 ^a	12,8 ^d	1037	1036
8	15,94	trans-β-ocimeno	0,1 ^b	ND ^a	ND ^a	ND ^a	1,5 ^c	1055	1056
9	16,12	dihidrotagetona	0,3 ^b	1,9 ^c	0,4 ^b	ND ^a	ND ^a	1060	1059
10	17,06	α-terpinoleno	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	0,4 ^b	1084	1089
11	17,64	linalool*	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	0,3 ^b	1098	1103
12	19,30	alcanfor	3,3 ^b	6,9 ^d	1,9 ^a	3,3 ^b	4,6 ^c	1147	1146
13	19,57	trans-tagetona	0,5 ^b	2,0 ^c	0,6 ^b	0,2 ^a	0,7 ^b	1154	1151
14	20,01	borneol	0,9 ^b	ND ^a	1,7 ^c	0,3 ^b	0,7 ^b	1167	1171
15	21,13	cis-dihidrocarvona	17,9 ^b	9,2 ^a	14,4 ^b	26,7 ^c	16,0 ^b	1200	1200
16	21,43	trans-dihidrocarvona	11,7 ^b	16,5 ^c	12,7 ^b	10,5 ^a	16,3 ^c	1210	1213
17	21,71	isodihidrocarveol	0,9 ^c	ND ^a	1,4 ^c	1,0 ^c	0,2 ^b	1219	1214
18	21,79	carveol	0,4 ^b	ND ^a	1,1 ^c	0,6 ^b	0,7 ^{b,c}	1121	1220
19	22,13	cis-tagetenona	2,1	3,2	2,9	2,6	2,3	1232	1231
20	22,41	trans-tagetenona	1,5	1,0	2,1	1,8	2,0	1241	1240
21	22,57	carvona	1,5 ^b	1,2 ^b	2,4 ^c	2,1 ^c	0,5 ^a	1246	1246
22	23,13	p-cimen-7-ol	ND ^a	ND ^a	0,3 ^b	ND ^a	ND ^a	1264	1265
23	23,35	isopiperitenona	0,7 ^{b,c}	ND ^a	1,1 ^c	0,5 ^b	0,3 ^b	1271	1272
24	23,81	1-butenil-tiofeno	0,1 ^b	1,4 ^c	0,6 ^b	ND ^a	ND ^a	1285	-
25	23,98	timol*	0,3	0,8	0,6	0,4	0,2	1291	1292

Tabla 7.2. Continuación.

Pico	tr ^a (min)	Compuesto ^b	H ^f	T ^g	% ^c I ^h	P. E. ⁱ	A. E. ^j	KI ^e ^d	KI ^e ^e
26	24,80	hexil tiglató	0,3 ^b	ND ^a	ND ^a	0,2 ^b	0,2 ^b	1318	1316
27	24,91	cis-3-hexenil tiglató	0,5 ^b	ND ^a	ND ^a	0,4 ^b	ND ^a	1323	1325
28	25,26	bicicloelemeno	4,1 ^c	1,4 ^a	2,5 ^b	4,2 ^c	2,1 ^b	1335	1334
29	25,45	piperitenona	2,6 ^b	2,8 ^b	6,9 ^d	0,9 ^a	3,8 ^c	1342	1344
30	25,83	eugenol	0,4 ^b	ND ^a	0,5 ^b	0,8 ^b	0,6 ^b	1355	1359
31	26,14	óxido de piperitenona	2,1 ^b	7,2 ^c	8,2 ^{c,d}	0,3 ^a	8,9 ^d	1365	1369
32	26,25	isolemeno	0,2 ^b	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	1369	1377
33	26,87	β-elemeno	0,5	0,9	0,9	0,5	0,5	1391	1387
34	27,10	metileugenol	1,0	1,4	1,1	0,6	0,9	1399	1400
35	27,31	α-gurgujeno	0,3 ^b	ND ^a	ND ^a	0,2 ^b	ND ^a	1407	1408
36	27,70	β-cariofileno*	7,9 ^c	9,1 ^d	6,9 ^b	7,2 ^b	2,2 ^a	1422	1415
37	27,82	longifoleno	0,4 ^b	0,9 ^c	0,3 ^b	0,4 ^b	ND ^a	1426	1424
38	28,02	tujopseno	0,4 ^b	ND ^a	0,5 ^b	ND ^a	ND ^a	1434	1433
39	28,19	aromadendreno	4,0 ^d	3,2 ^c	2,1 ^b	4,4 ^d	ND ^a	1440	1441
40	28,44	cis-β-farneseno	2,0 ^b	0,9 ^a	1,1 ^a	1,8 ^b	1,3 ^a	1450	1448
41	28,56	α-humuleno	2,4 ^b	2,2 ^b	2,1 ^b	2,4 ^b	0,5 ^a	1454	1452
42	28,66	α-guaieno	0,2 ^b	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	1458	1457
43	28,71	allo-aromadendreno	0,4 ^b	ND ^a	0,5 ^b	0,4 ^b	ND ^a	1460	1460
44	29,53	α-zingibereno	1,0 ^b	2,0 ^c	3,5 ^d	1,7 ^c	ND ^a	1491	1490
45	29,77	biciclogermacreno	10,1 ^d	4,5 ^b	5,6 ^c	9,2 ^d	3,4 ^a	1498	1495
46	29,85	β-bisaboleno	0,5 ^b	1,8 ^c	0,5 ^b	ND ^a	ND ^a	1503	1506
47	29,93	hidroxitolueno butilado	ND ^a	ND ^a	0,3 ^b	0,3 ^b	0,4 ^b	1506	1505
48	30,08	γ-cadineno	0,1 ^b	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	1512	1512
49	30,27	β-cadineno	0,3 ^b	ND ^a	0,2 ^b	ND ^a	ND ^a	1519	1518
50	30,87	α-bisaboleno	12,2 ^d	7,6 ^b	9,9 ^c	11,7 ^d	1,1 ^a	1544	1540
51	31,37	γ-calacoreno	0,3 ^b	ND ^a	ND ^a	0,3 ^b	ND ^a	1564	1558
52	31,76	β-copaen-4-α-ol	0,6 ^b	2,1 ^c	0,3 ^b	0,4 ^b	ND ^a	1579	1579
53	31,96	cis-α-copaen-8-ol	0,4 ^b	1,5 ^c	0,7 ^{b,c}	0,4 ^b	ND ^a	1587	1595
54	32,30	spatulenol	0,1 ^b	ND ^a	0,1 ^b	0,2 ^b	0,2 ^b	1601	1605
55	33,16	isospatululol	0,2 ^b	ND ^a	0,2 ^b	0,2 ^b	0,9 ^c	1637	1638
56	33,27	δ-cadinol	0,1 ^b	ND ^a	0,2 ^b	0,2 ^b	0,5 ^b	1642	1642
57	33,62	α-cadinol	0,2 ^b	ND ^a	0,1 ^b	ND ^a	ND ^a	1656	1653
Total			100,0	100,0	100,0	100,0	100,0		
% Compuestos Identificados			100,0	100,0	100,0	100,0	100,0		
% Área Identificada			100,0	100,0	100,0	100,0	100,0		
Volátiles terpenoides			97,7	97,2	97,2	97,8	97,2		
Monoterpenos hidrocarbonados			2,1	6,3	0,7	1,1	23,7		
Monoterpenos oxigenados			46,5	52,7	58,6	50,9	57,4		
Sesquiterpenos hidrocarbonados			47,4	34,5	36,4	44,4	14,4		
Sesquiterpenos oxigenados			1,7	3,6	1,5	1,4	1,6		
Volátiles fenilpropanoides/bencenoides			1,4	1,4	1,6	1,4	1,5		
Otros			0,9	1,4	1,2	0,8	1,3		

^a Tiempo de retención; ^b Identificados por GC-MS; ^c Cuantificados por GC-FID, letras distintas indican diferencias significativas del ANOVA con test Tukey (p<0,05); ^d Índices de retención de Kovat's experimentales; ^e Índices de retención de Kovat's de literatura; ^f Hojas; ^g Tallos; ^h Inflorescencias; ⁱ Planta Entera; ^j Aceite Esencial; ND: Compuesto No Detectado; * Compuestos identificados también por comparación con estándares de Sigma-Aldrich.

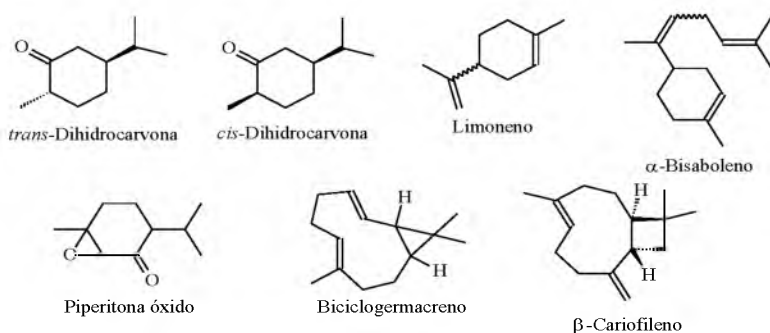


Figura 7.8. Componentes volátiles mayoritarios hallados en *L. balansae* por análisis del aceite esencial y por muestreo mediante HS-SPME.²

² Fuente de las estructuras químicas: Base de datos NIST: <http://webbook.nist.gov/chemistry/>

Los CVV en *L. balansae* son principalmente del tipo terpenoide, con un alto porcentaje de monoterpenos oxigenados y sesquiterpenos hidrocarbonados, encontrándose en menor proporción volátiles de la ruta biosintética derivada del Shikimato (bencenoides/fenilpropanoides). No se hallaron CVV derivados de la vía LOX (GLV y/o jasmonatos).

7.3.1- Comparación entre el análisis por HS-SPME y del aceite esencial

A partir del análisis del AE de *L. balansae*, se hallaron 37 CVV diferentes, todos identificados, mientras que por HS-SPME de sus partes aéreas juntas, se encontraron 40 CVV, lográndose la identificación positiva de todos ellos. Esta situación representa la caracterización de un 8 % más de CVV mediante el análisis por HS-SPME (Tabla 7.2).

Tanto en el AE como en el muestreo por HS-SPME, los CVV mayoritarios fueron *cis*-dihidrocarvona y *trans*-dihidrocarvona, aunque en cantidades diferentes.

Comparando los resultados del análisis del AE y por HS-SPME, hay algunas diferencias destacables:

- (a) Si bien la cantidad de volátiles totales no fue diferente entre el análisis del AE y por HS-SPME, algunos componentes hallados por HS-SPME no se encontraron en el AE. En este sentido, *cis*-3-hexenil tiglató, α -gurgujeno, longifoleno, aromadendreno, *allo*-aromadendreno, α -zingibereno, γ -calacoreno, β -copaen-4- α -ol y *cis*- α -copaen-8-ol fueron componente solo observados por HS-SPME. Mientras que, en menor proporción, algunos componentes identificados en el AE no se encontraron por HS-SPME. Ellos fueron α -pineno, β -pineno, canfeno, sabineno, α -terpinoleno y linalool.
- (b) Una diferencia importante fue que limoneno se presentó como uno de los componentes principales del AE, mientras que por HS-SPME se lo encontró en menos del 1 %.
- (c) Adicionalmente, se observan diferencias importantes en las cantidades de β -mirceno, carvona, bicicloelemeno, piperitenona, piperitenona óxido, β -cariofileno, α -humuleno, biciclogermacreno y α -bisaboleno.
- (d) Es interesante observar que en el AE se encontró una proporción mayor de monoterpenos hidrocarbonados en comparación con la hallada por HS-SPME, mientras que en el caso de los

sesquiterpenos hidrocarbonados ocurre lo contrario, encontrándose mayor proporción por HS-SPME que en el AE.

Estas diferencias observadas entre los resultados obtenidos por HS-SPME de las partes aéreas frescas y a partir del AE podrían explicarse por los procesos enzimáticos (Croteau *et al.*, 1991) y los cambios microbiológicos (Madyastha & Thulasiram, 1999) ocurridos durante el secado del material previo a la hidrodestilación, además de reacciones químicas que pueden ocurrir durante la hidrodestilación (Babu *et al.*, 2004; Babu & Kaul, 2007). También se deben considerar posibles afinidades diferentes del recubrimiento de la fibra por los analitos, especialmente los de bajo peso molecular y de mayor polaridad, que tienen mayor probabilidad de ser adsorbidos por las capas de DVB y CAR, donde pueden producirse competencias por los sitios de unión (Wercinski, 1999; Pawliszyn, 2012).

7.3.2- Diferencias entre la composición de inflorescencias, tallos y hojas

Trans-dihidrocarvona, *cis*-dihidrocarvona, α -bisaboleno y biciclogermacreno se encontraron en concentración importante en las tres partes de *L. balansae* (Tabla 7.2), aunque en porcentajes diferentes.

Comparando los resultados obtenidos en las diferentes partes aéreas de *L. balansae*, las diferencias y similitudes fueron:

- (a) Tanto las inflorescencias como las hojas son responsables de la mayor cantidad de CVV (41 y 49 respectivamente), mientras que los tallos contribuyen un número menor (sólo 28 compuestos).
- (b) α -Felandreno, *trans*- β -ocimeno, hexil tiglató, *cis*-3-hexenil tiglató, isodieno, α -gurgujeno, α -guaieno, α -cadineno y α -calacoreno se detectaron solamente en las hojas.
- (c) *p*-Cimen-7-ol e hidrotolueno butilado sólo se encontraron en las inflorescencias.
- (d) No hubo CVV presentes sólo en los tallos.
- (e) Los tallos tuvieron la proporción más alta de monoterpenos hidrocarbonados. Las inflorescencias y los tallos mostraron mayor porcentaje de monoterpenos oxigenados que las hojas.
- (f) Las hojas fueron más ricas en sesquiterpenos hidrocarbonados, mientras que los tallos tuvieron mayor proporción de sesquiterpenos oxigenados.

(g) La proporción de CVV derivados de la vía de Shikimato fue aproximadamente la misma en las diferentes partes de la planta.

No se encontraron estudios previos de caracterización diferencial de la composición de volátiles en las diferentes partes aéreas de *L. balansae*.

7.4- Caracterización de compuestos volátiles en *Lantana grisebachii*

Los CVV de *L. grisebachii* se caracterizaron mediante las técnicas de hidrodestilación y HS-SPME (Tabla 7.3). Las estructuras químicas de los componentes volátiles mayoritarios se muestran en la figura 7.9.

Tabla 7.3. Componentes volátiles hallados en *L. grisebachii* por análisis del aceite esencial y HS-SPME, usando una fibra DVB-CAR-PDMS 50/30 μm ; temperatura de extracción de 40 $^{\circ}\text{C}$; 10 minutos de equilibrio del HS y 60 minutos de exposición de la fibra en el HS. Se muestran valores promedios de tres determinaciones, cuyos coeficientes de variación fueron menores al 5 %.

Pico	t_r ^a (min)	Compuesto ^b	H ^f	T ^g	% ^c I ^h	P. E. ⁱ	A. E. ^j	KI ^e ^d	KI ^e ^e
1	8,74	hexen-3-ol	1,0 ^c	ND ^a	ND ^a	0,2 ^b	ND ^a	890	853
2	11,27	α -pineno	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	0,2 ^b	948	948
3	11,83	canfeno	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	0,2 ^b	960	960
4	12,85	β -pineno	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	0,2 ^b	981	980
5	13,47	1-octen-3-ol	0,2 ^b	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	994	991
6	14,49	<i>cis</i> -3-hexenil acetato	3,6 ^c	0,4 ^b	ND ^a	1,1 ^c	ND ^a	1019	1016
7	14,81	<i>trans</i> -2-hexenil acetato	1,5 ^c	ND ^a	ND ^a	0,2 ^b	0,1 ^b	1027	1028
8	15,57	<i>cis</i> - β -ocimeno	0,2 ^b	ND ^a	0,5 ^b	0,4 ^b	0,4 ^b	1046	1041
9	15,94	<i>trans</i> - β -ocimeno	ND ^a	ND ^a	0,4 ^b	0,3 ^b	0,2 ^b	1055	1056
10	17,74	linalool*	0,4	0,6	0,7	0,3	0,2	1101	1103
11	24,75	hexil tiglató	0,2 ^b	0,2 ^b	ND ^a	0,2 ^b	ND ^a	1317	1316
12	24,93	<i>cis</i> -3-hexenil tiglató	0,4 ^a	0,3 ^a	0,5 ^a	0,4 ^a	1,2 ^b	1323	1325
13	25,21	bicicloelemeno	3,3 ^c	2,2 ^b	3,0 ^c	3,1 ^c	0,2 ^a	1333	1334
14	25,53	α -cubebeno	0,9 ^b	1,2 ^b	1,0 ^b	0,9 ^b	0,2 ^a	1344	1347
15	25,75	eugenol	0,2 ^b	0,5 ^b	ND ^a	ND ^a	0,2 ^b	1352	1359
16	26,21	α -ylangeno	0,5	0,4	0,6	0,2	0,2	1368	1364
17	26,32	α -copaeno	1,9	1,9	2,2	1,9	2,4	1372	1372
18	26,57	β -bourboneno	0,6	0,5	0,3	0,9	0,9	1381	1384
19	26,79	β -elemeno	4,0 ^b	3,8 ^b	3,1 ^a	4,4 ^b	5,4 ^c	1388	1388
20	26,88	<i>cis</i> -jasmona	0,1 ^b	0,4 ^b	0,2 ^b	0,2 ^b	ND ^a	1391	1394
21	27,31	α -gurgujeno	0,3 ^b	ND ^a	0,4 ^b	0,3 ^b	0,2 ^b	1407	1408
22	27,61	β -cariofileno*	4,9 ^b	3,1 ^a	4,9 ^b	5,8 ^c	6,6 ^c	1419	1415
23	27,83	β -gurjurenó (calarenó)	0,8 ^b	0,7 ^b	0,7 ^b	0,8 ^b	0,2 ^a	1427	1421
24	28,01	γ -elemeno	7,0 ^b	8,1 ^c	7,9 ^c	9,9 ^d	1,9 ^a	1433	1431
25	28,22	aromandendrenó	6,6 ^c	5,6 ^b	6,2	5,9 ^{b,c}	0,6 ^a	1441	1441
26	28,40	<i>cis</i> - β -farneseno	1,1	1,1	1,2	1,1	1,1	1448	1448
27	28,58	α -humuleno	4,1	3,1	4,1	4,5	4,8	1455	1452
28	28,75	<i>allo</i> -aromadendrenó	2,8	2,9	3,1	2,8	2,2	1461	1460

Tabla 7.3. Continuación.

Pico	t _R ^a (min)	Compuesto ^b	H ^f	T ^g	% ^c I ^h	P. E. ⁱ	A. E. ^j	KI ^e ^d	KI ^e
29	29,19	α -amorfeno	3,9 ^b	3,9 ^b	4,2 ^b	4,2 ^b	ND ^a	1478	1465
30	29,34	germacreno D	7,2 ^b	6,2 ^a	7,2 ^b	6,8 ^{a,b}	13,2 ^c	1483	1480
31	29,45	β -selineno	1,4 ^a	1,9 ^b	2,9 ^c	2,7 ^c	1,2 ^a	1388	1389
32	29,50	valenceno	1,0 ^b	0,6 ^b	ND ^a	ND ^a	ND ^a	1489	1490
33	29,78	biciclogermacreno	13,8	12,5	13,2	13,0	13,8	1500	1495
34	29,94	ledeno	5,1	5,0	4,8	5,9	4,9	1507	1505
35	30,15	γ -cadineno	3,1 ^b	4,3 ^c	3,8 ^c	3,1 ^b	2,0 ^a	1515	1512
36	30,37	δ -cadineno	6,3 ^b	8,1 ^d	7,3 ^c	5,9 ^b	3,0 ^a	1524	1522
37	30,58	cadina-1,4-dieno	0,9	1,4	1,0	0,9	0,5	1532	1532
38	30,71	epizonareno	2,9 ^b	3,6 ^b	3,2 ^b	2,9 ^b	0,9 ^a	1537	1537
39	30,86	selina-3,7(11)-dieno	1,4 ^{a,b}	2,5 ^c	1,6 ^{a,b}	1,8 ^{b,c}	0,9 ^a	1543	1544
40	31,24	germacreno B	1,2 ^a	1,6 ^a	1,5 ^a	2,3 ^b	8,2 ^c	1559	1558
41	31,30	epiglobulol	0,5 ^b	1,5 ^c	0,5 ^b	ND ^a	ND ^a	1561	1564
42	31,72	germacren-4-ol	0,3 ^a	0,9 ^b	0,3 ^a	0,6 ^{a,b}	3,9 ^c	1578	1576
43	31,94	<i>cis</i> - α -copaen-8-ol	0,2 ^a	0,7 ^b	0,4 ^{a,b}	0,3 ^a	1,4 ^c	1587	1595
44	32,40	spatulanol	0,2 ^a	0,6 ^{a,b}	0,2 ^a	0,2 ^a	1,2 ^b	1605	1605
45	32,66	carotol	2,8 ^a	6,5 ^b	2,7 ^a	2,5 ^a	7,6 ^c	1616	1614
46	33,21	δ -cadinol	0,3 ^b	0,4 ^b	ND ^a	0,3 ^b	1,7 ^c	1639	1642
47	33,55	α -cadinol	0,2 ^b	0,3 ^b	ND ^a	0,2 ^b	2,5 ^c	1654	1653
48	33,86	valerenal	0,2 ^b	0,5 ^b	ND ^a	0,1 ^b	1,7 ^c	1667	1668
49	35,04	valerenol	ND ^a	ND ^a	1,4 ^b	ND ^a	1,2 ^b	1717	1711
50	36,55	α -costol	ND ^a	ND ^a	2,5 ^c	0,4 ^b	0,2 ^b	1785	1785
51	40,82	isofitol	0,5 ^b	ND ^a	0,4 ^b	ND ^a	0,2 ^b	1948	1949
Total			100,0	100,0	100,0	100,0	100,0		
% Compuestos Identificados			100,0	100,0	100,0	100,0	100,0		
% Área Identificada			100,0	100,0	100,0	100,0	100,0		
Volátiles terpenoides			92,3	98,2	98,9	97,7	98,2		
Monoterpenos hidrocarbonados			0,2	ND	0,8	0,7	1,1		
Monoterpenos oxigenados			0,4	0,6	0,7	0,3	0,2		
Sesquiterpenos hidrocarbonados			87,1	86,2	89,3	92,1	75,4		
Sesquiterpenos oxigenados			4,6	11,4	8,0	4,6	21,5		
Volátiles fenilpropanoides/bencenoides			0,2	0,5	ND	ND	0,2		
Volátiles derivados de ácidos grasos			6,5	0,8	0,2	1,7	0,1		
Otros			1,0	0,5	0,9	0,6	1,5		

^a Tiempo de retención; ^b Identificados por GC-MS; ^c Cuantificados por GC-FID, letras distintas indican diferencias significativas del ANOVA con test Tukey (p<0,05); ^d Índices de retención de Kovat's experimentales; ^e Índices de retención de Kovat's de literatura; ^f Hojas; ^g Tallos; ^h Inflorescencias; ⁱ Planta Entera; ^j Aceite Esencial; ND: Compuesto No Detectado; * Compuestos identificados también por comparación con estándares de Sigma-Aldrich.

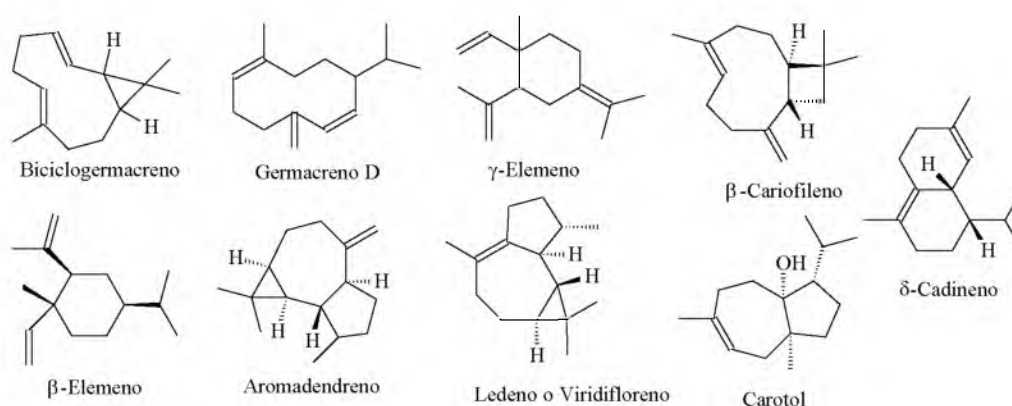


Figura 7.9. Componentes volátiles mayoritarios de *L. grisebachii*.³

³ Fuente de las estructuras químicas: Base de datos NIST: <http://webbook.nist.gov/chemistry/>

Los CVV hallados en *L. grisebachii* fueron principalmente del tipo terpenoide, con un alto porcentaje de sesquiterpenos hidrocarbonados, encontrándose en menor proporción volátiles de la ruta biosintética derivada de la vía LOX (GLV y derivados del jasmonato) y del Shikimato (bencenoides/fenilpropanoides).

7.4.1- Comparación entre el análisis por HS-SPME y del aceite esencial

A partir del análisis del AE de *L. grisebachii*, se hallaron 43 CVV diferentes, todos ellos identificados, mientras que por HS-SPME se encontraron aproximadamente la misma cantidad (42), aunque hubo algunas diferencias en el tipo de CVV hallados en cada caso.

Tanto en el AE como en el muestreo por HS-SPME, el CVV mayoritario fue bicilgermacreno, en cantidades semejantes.

Comparando los CVV hallados en el AE y por HS-SPME, hay algunas diferencias destacables:

- (a) Si bien la cantidad de volátiles totales no fue diferente, algunos CVV hallados por HS-SPME no se encontraron en el aceite esencial: hexen-3-ol, *cis*-3-hexenil acetato, hexil tiglató, *cis*-jasmona y α -amorfeno. Por otro lado, algunos componentes identificados en el AE no se encontraron por HS-SPME: α -pineno, canfeno y β -pineno.
- (b) Se encontraron diferencias en las cantidades de algunos componentes, siendo los que mayores diferencias mostraron: *cis*-3-hexenil tiglató, γ -elemeno, aromandendreno, germacreno D, δ -cadineno, epizonareno, germacreno B, germacren-4-ol, carotol y valerenal.
- (c) En el AE se encontró una proporción mayor de sesquiterpenos oxigenados en comparación con HS-SPME, y, concomitantemente, una mayor concentración de sesquiterpenos hidrocarbonados por HS-SPME frente a la encontrada en el AE.
- (d) Se determinó una mayor proporción de CVV derivados de la vía LOX por HS-SPME que en el AE.

Estas diferencias observadas entre los resultados obtenidos por HS-SPME de partes aéreas frescas y en el AE podrían ser explicadas por los mismos procesos descritos para *L. balansae* (Croteau *et al.*, 1991; Madyastha & Thulasiram, 1999; Wercinski, 1999; Babu *et al.*, 2004; Babu & Kaul, 2007; Pawliszyn, 2012).

La composición de CVV mayoritarios encontrados por HS-SPME y en el AE de *L. grisebachii* es relativamente coincidente con lo reportado por otros investigadores (García *et al.*, 2010), quienes sólo informan 6 componentes mayoritarios, siendo uno de ellos piperitenona, el cual no se encontró ni en el AE ni por HS-SPME de las muestras estudiadas en el presente trabajo.

7.4.2- *Diferencias entre la composición de inflorescencias, tallos y hojas*

Biciclogermacreno fue el CVV mayoritario en las tres partes de *L. grisebachii* (Tabla 7.3), en cantidades semejantes.

Comparando los resultados obtenidos en las diferentes partes aéreas de *L. grisebachii*, algunas de las diferencias y semejanzas más importantes halladas se pueden resumir en:

- (a) El número de CVV encontrados en las diferentes partes de la plantas es aproximadamente el mismo, aunque mayor en hojas (45 frente a 38 en inflorescencias y 39 en tallos).
- (b) La proporción de algunos componentes fue diferente en las distintas partes aéreas estudiadas, como puede observarse en el caso de *cis*-3-hexenil acetato, epiglobulol y carotol.
- (c) Hexen-3-ol, 1-octen-3-ol y *trans*-2-hexenil acetato sólo se encontraron en las hojas.
- (d) *Trans*- β -ocimeno, valerenol y α -costol sólo se encontraron en las inflorescencias.
- (e) Los CVV hallados en los tallos también se encontraron en las demás partes de la planta.
- (f) Las cantidades de monoterpenos hidrocarbonados y oxigenados fue aproximadamente la misma en las diferentes partes de la planta.
- (g) Se encontró un porcentaje mayor de sesquiterpenos oxigenados en los tallos que en las hojas e inflorescencias, mientras que la proporción de sesquiterpenos hidrocarbonados fue aproximadamente la misma en las distintas partes de la planta.
- (h) Las hojas tuvieron mayor proporción de CVV derivados de la vía LOX en comparación con los tallos y las inflorescencias, mientras que en el caso de los CVV derivados del Shikimato (bencenoides/fenilpropanoides), fue aproximadamente la misma en las diferentes partes de la planta.

No se encontraron estudios previos de caracterización diferencial de la composición de volátiles en diferentes partes aéreas de *L. grisebachii*.

7.5- Caracterización de compuestos volátiles en *Lantana camara* provenientes de especímenes con flores de colores diferentes

Los CVV de *L. camara* se caracterizaron en el AE y por HS-SPME, resumiéndose los resultados en la tabla 7.4. Las estructuras químicas de los componentes volátiles mayoritarios se muestran en la figura 7.10.

Si bien en todas las variedades de *L. camara* estudiadas se encontró mayor proporción de CVV del tipo terpenoide, se observó una gran variabilidad en la proporción de volátiles derivados de la vía LOX (GLV y derivados del jasmonato). En general, predominaron los sesquiterpenos hidrocarbonados.

7.5.1- *L. camara* de flores de color rosa y amarillo

7.5.1.1- Comparación entre el análisis por HS-SPME y del aceite esencial

A partir del análisis del AE de *L. camara* de flores de color rosa y amarillo, se hallaron 46 CVV diferentes, de los cuales se identificaron 45 (97,8 %), lo que corresponde al 99,5 % del área total del cromatograma; mientras que por HS-SPME, se encontraron 71 CVV, lográndose la identificación positiva de 70 de ellos (98,6 %), lo que corresponde al 99,5 % del área total del cromatograma. Esta situación representa la caracterización de aproximadamente un 37 % más de CVV mediante el análisis por HS-SPME (Tabla 7.4).

Hexen-3-ol y γ -curcumeno fueron componentes mayoritarios tanto en el AE como en el muestreo por HS-SPME, aunque en cantidades diferentes. Sin embargo, por HS-SPME se hallaron otros compuestos mayoritarios que en el AE se encontraron en porcentajes menores: 1-octen-3-ol, β -cariofileno y *ar*-curcumeno.

Tabla 7.4. Continuación.

Pico	Compuesto ^a	KI ^b	KI ^c	% ^d																						
				Flor rosa y amarillo					Flor naranja y amarillo					Flor amarilla					Flor blanca							
				H	T	I	PE	AE	H	T	I	PE	AE	H	T	I	PE	AE	H	T	I	PE	AE			
31	<i>trans</i> -sabinol	1145	1143	0,2 ^b	0,5 ^b	0,5 ^b	0,4 ^b	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	0,3 ^b	ND ^a	0,1 ^b	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a
32	<i>n</i> -hexil isobutirato	1151	1150	ND ^a	ND ^a	0,6 ^b	0,1 ^b	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a
33	2,6-(E,Z)-nonadienal	1153	1151	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	0,9 ^c	ND ^a	0,5 ^{b,c}	0,1 ^b	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	0,6 ^{b,c}	0,4 ^b	ND ^a		ND ^a
34	pinocarvona	1157	1157	0,4 ^b	0,3 ^b	0,2 ^b	0,5 ^b	ND ^a	0,1 ^b	0,3 ^b	0,2 ^b	0,2 ^b	ND ^a	ND ^a	ND ^a	0,7 ^b	0,2 ^b	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	0,5 ^b	0,6 ^b	ND ^a		ND ^a
35	epoxilinalol	1164	1163	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	0,3 ^b	ND ^a	2,2 ^d	0,4 ^b	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	1,1 ^c	ND ^a	ND ^a		ND ^a
36	borneol	1170	1171	ND ^a	ND ^a	1,3 ^c	1,4 ^c	ND ^a	ND ^a	1,6 ^c	2,6 ^d	0,3 ^b	ND ^a	0,8 ^{b,c}	ND ^a	1,0 ^c	0,1 ^b	ND ^a	1,5 ^c	1,1 ^c	0,5 ^b	1,0 ^c	1,2 ^c			ND ^a
37	terpinen-4-ol	1178	1178	0,3 ^b	1,3 ^c	0,5 ^b	1,6 ^c	ND ^a	ND ^a	1,2 ^c	2,0 ^d	0,2 ^b	ND ^a	ND ^a	0,5 ^b	0,8 ^c	0,6 ^{b,c}	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	0,9 ^c	ND ^a			ND ^a
38	<i>cis</i> -3-hexenil butirato	1181	1183	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	1,5 ^c	0,4 ^b	0,3 ^b	ND ^a	ND ^a	0,2 ^b	0,4 ^b	ND ^a			0,1 ^b	
39	metil salicilato	1189	1189	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	0,3 ^b	1,9 ^c	0,7 ^b	0,2 ^b			
40	α -terpineol	1190	1190	0,4 ^b	0,4 ^b	0,3 ^b	0,6 ^b	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	0,6 ^b	0,4 ^b	0,1 ^b	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a		ND ^a
41	mirtenol	1197	1198	0,3 ^b	0,3 ^b	1,5 ^c	0,8 ^{b,c}	ND	ND	0,7 ^{b,c}	2,0 ^d	1,5 ^c	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	0,2 ^b	0,4 ^b	0,4 ^b	0,2 ^b			
42	verbenona	1209	1209	0,1 ^b	0,2 ^b	0,2 ^b	0,1 ^b	0,1 ^b	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a		ND ^a
43	nerol	1229	1229	0,3 ^b	0,4 ^b	0,4 ^b	0,6 ^b	ND ^a	ND ^a	ND ^a	0,6 ^b	0,2 ^b	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a		ND ^a
44	<i>cis</i> -carveol	1235	1236	ND ^a	ND ^a	0,8 ^b	2,0 ^c	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a		ND ^a
45	pulegona	1237	1237	0,2 ^b	ND ^a	0,2 ^b	0,3 ^b	ND ^a	0,1 ^b	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a		ND ^a
46	neral (β -citral)	1239	1239	ND ^a	ND ^a	0,1 ^b	0,2 ^b	ND ^a	ND ^a	0,3 ^b	0,5 ^b	0,5 ^b	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a		ND ^a
47	geraniol	1244	1247	ND ^a	ND ^a	0,1 ^b	0,3 ^b	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a		ND ^a
48	geranial (α -citral)	1256	1260	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	0,1 ^b	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	0,4 ^b	ND ^a	0,4 ^b	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a		ND ^a
49	<i>cis</i> -3-hexenil angelato	1285	1282	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	0,1 ^b	0,3 ^b	0,1 ^b	0,3 ^b	ND ^a	ND ^a	0,3 ^b	0,1 ^b	ND ^a			0,1 ^b	
50	timol*	1291	1292	0,4 ^b	0,2 ^b	0,6	0,2 ^b	ND ^a	ND ^a	ND ^a	0,1 ^b	0,3	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	1,1 ^c	0,3 ^b	0,6 ^{b,c}		
51	No Identificado	1296	-	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	0,2 ^b	ND ^a	0,2 ^b		
52	No Identificado	1311	-	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	0,2 ^b	ND ^a	ND ^a		
53	hexil tiglató	1318	1316	0,2 ^b	0,4 ^b	1,0 ^c	0,4 ^b	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	0,3 ^b	ND ^a	0,4 ^b	0,3 ^b	0,1 ^b			
54	<i>cis</i> -3-hexenil tiglató	1323	1325	ND ^a	ND ^a	0,7 ^b	2,1 ^c	ND ^a	ND ^a	ND ^a	0,1 ^b	0,3 ^b	ND ^a	0,1 ^b	ND ^a	0,2 ^b	0,2 ^b	ND ^a	4,1 ^d	1,6 ^c	4,0 ^d	3,9 ^d	ND ^a			
55	δ -elemeno	1330	1330	ND ^a	ND ^a	1,0 ^c	0,4 ^b	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	0,2 ^b	ND ^a	2,1 ^d			
56	bicicloelemeno	1335	1334	0,6 ^c	ND ^a	0,6 ^c	0,7 ^c	ND ^a	0,5 ^c	ND ^a	0,1 ^b	0,2 ^b	ND ^a	0,2 ^b	ND ^a	0,2 ^b	0,2 ^b	ND ^a	0,3 ^b	0,1 ^b	0,3 ^b	0,5 ^c	0,3 ^b			
57	α -cubebena	1346	1347	0,6 ^{b,c}	0,9 ^c	1,0 ^c	0,6 ^{b,c}	ND ^a	0,4 ^b	0,3 ^b	0,1 ^b	0,2 ^b	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	0,2 ^b	0,1 ^b	0,6 ^{b,c}			
58	No Identificado	1352	-	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	0,5 ^b	0,1 ^b	ND ^a			
59	No Identificado	1359	-	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	0,3 ^b	2,0 ^c	ND ^a			
60	α -ylangeno	1364	1364	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	0,5 ^b	ND ^a	0,1 ^b	0,2 ^b	0,3 ^b	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a		
61	α -copaeno	1368	1372	1,0 ^c	1,0 ^c	2,3 ^d	1,4 ^c	0,4 ^b	1,4 ^c	1,2 ^c	1,3 ^c	1,6 ^c	0,3 ^b	0,3 ^b	ND ^a	0,1 ^b	0,2 ^b	0,2 ^b	1,1	0,9 ^c	1,5 ^c	0,1 ^b	2,1 ^{c,d}			
62	isoleveno	1369	1377	ND ^a	ND ^a	0,2 ^b	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	0,3 ^b	0,1 ^b	ND ^a	0,2 ^b	ND ^a	0,6 ^c	0,4 ^{b,c}	1,0 ^c	0,9 ^c	0,3 ^b			

Tabla 7.4. Continuación.

Pico	Compuesto ^a	Kl _e ^b	Kl _r ^c	% ^d																			
				Flor rosa y amarillo					Flor naranja y amarillo					Flor amarilla					Flor blanca				
				H	T	I	PE	AE	H	T	I	PE	AE	H	T	I	PE	AE	H	T	I	PE	AE
63	β-bourboneno	1384	1384	0,5 ^{b,c}	0,3 ^b	0,3 ^b	1,9 ^d	0,4 ^b	0,3 ^b	ND	ND	0,2 ^b	0,8 ^c	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	0,5 ^{b,c}	0,5 ^{b,c}	ND ^a	ND ^a	ND ^a
64	β-elemeno	1391	1389	1,1 ^c	0,7 ^{b,c}	2,0 ^d	0,3	ND ^a	3,1 ^e	0,3 ^b	ND ^a	1,1 ^c	ND ^a	1,3 ^c	0,5 ^b	1,3 ^c	1,2 ^c	4,6 ^f	ND ^a	ND ^a	1,1 ^c	0,4 ^b	1,1 ^c
65	cis-jasmona	1392	1394	0,2 ^b	0,7 ^c	0,8 ^c	0,8	0,2 ^b	0,1 ^b	0,2 ^b	2,9 ^d	0,7 ^c	ND ^a	0,2 ^b	0,1 ^b	0,5 ^{b,c}	0,5 ^{b,c}	3,3 ^d	ND ^a	ND ^a	0,7 ^c	0,3 ^b	0,1 ^b
66	β-cubebeno	1399	1400	0,4 ^b	0,3 ^b	0,7 ^{b,c}	0,5 ^b	ND ^a	0,9 ^c	0,6 ^{b,c}	0,4 ^b	0,5 ^b	ND ^a	0,4 ^b	0,4 ^b	1,1 ^c	1,3 ^c	1,6 ^c	ND ^a	ND ^a	0,4 ^b	0,4 ^b	0,4 ^b
67	α-cedreno	1411	1412	0,3 ^b	ND ^a	0,3 ^b	0,2 ^b	0,1 ^b	0,4 ^b	0,2 ^b	0,5 ^b	0,1 ^b	0,3 ^b	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	9,4 ^c	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a
68	β-cariofileno*	1415	1415	12,0 ^f	4,9 ^a	11,2 ^c	7,2 ^b	8,5 ^c	12,7 ^f	9,5 ^d	10,9 ^e	12,8 ^f	12,7 ^f	17,6 ^j	7,4 ^b	14,0 ^g	15,1 ^h	11,2 ^e	16,4 ⁱ	12,6 ^f	15,1 ^h	22,6 ^k	12,7 ^f
69	β-gurjureno (calareno)	1418	1421	0,9 ^c	1,0 ^c	1,6 ^d	1,4	0,2 ^b	1,0 ^d	0,3 ^b	0,5 ^b	1,6 ^d	ND ^a	0,7 ^{b,c}	0,2 ^b	0,5 ^b	0,6 ^{b,c}	1,0 ^c	1,1 ^c	0,6 ^{b,c}	0,9 ^c	1,1 ^c	0,5 ^b
70	β-funebreno	1422	1422	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	1,0 ^b	0,8 ^b	ND ^a	ND ^a	ND ^a
71	γ-elemeno	1427	1431	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	2,1 ^c	0,9 ^b	1,4 ^b	2,0 ^c	ND ^a
72	dehidroaromaden- dreno	1430	1434	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	1,9 ^d	1,0 ^c	1,0 ^c	2,0 ^d	0,3 ^b
73	aromadendreno	1440	1441	0,8 ^c	0,3 ^b	0,9 ^c	0,5 ^c	0,6 ^c	0,6 ^c	0,2 ^b	0,2 ^b	0,7 ^c	ND ^a	ND ^a	ND ^a	0,3 ^b	ND ^a	ND ^a	3,9 ^c	9,6 ^g	4,5 ^e	6,0 ^t	1,9 ^d
74	trans- geranilacetona	1444	1443	ND ^a	0,5 ^c	ND ^a	0,1 ^b	ND ^a	ND ^a	0,1 ^b	ND ^a	0,3 ^b	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a
75	cis-β-farneseno	1450	1448	1,3 ^c	9,3 ^f	0,8 ^c	0,3 ^b	0,7 ^c	0,4 ^a	7,7 ^e	ND ^a	0,9 ^c	0,1 ^b	ND ^a	1,9 ^d	0,2 ^b	0,2 ^b	1,7 ^d	ND ^a	ND ^a	2,1 ^d	ND ^a	1,6 ^{c,d}
76	α-humuleno	1454	1452	0,6 ^c	0,6 ^c	0,8 ^c	2,3 ^e	0,6 ^c	0,7 ^c	ND ^a	0,6 ^c	0,5 ^c	0,2 ^b	13,7 ^h	7,6 ^f	7,8 ^f	10,4 ^g	0,6 ^c	1,1 ^c	0,9 ^c	1,9 ^d	1,4 ^d	0,6 ^c
77	allo- aromadendreno	1459	1460	0,9 ^c	1,0 ^c	1,6 ^d	1,6 ^d	0,2 ^b	1,6 ^d	0,6 ^c	0,7 ^c	1,5 ^d	ND ^a	0,9 ^c	0,7 ^c	0,8 ^c	1,0 ^c	8,5 ^f	0,4 ^{b,c}	0,3 ^b	0,4 ^{b,c}	0,5 ^{b,c}	ND ^a
78	α-amorfenoleno	1459	1465	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	0,4 ^b	0,3 ^b	1,9 ^d	1,0 ^c	0,6 ^{b,c}	ND ^a	ND ^a	ND ^a
79	γ-curcumenoleno	1470	1474	4,1 ^e	3,1 ^d	12,0 ⁱ	6,0 ^f	10,0 ^h	25,1 ^l	8,6 ^g	13,6 ^j	16,8 ^k	24,6 ^l	3,1 ^d	1,9 ^c	12,5 ⁱ	10,7 ^h	0,8 ^b	4,2 ^e	2,1 ^c	3,1 ^d	2,4 ^c	4,9 ^e
80	ar-curcumenoleno	1473	1479	2,0 ^c	0,3 ^a	5,7 ^e	7,0 ^f	6,5 ^f	13,3 ⁱ	8,1 ^g	8,5 ^g	12,1 ^h	15,6 ^j	2,5 ^c	4,1 ^d	5,5 ^c	7,1 ^f	1,8 ^{b,c}	1,6 ^{b,c}	1,1 ^b	5,6 ^e	5,0 ^c	0,2 ^a
81	germacreno D	1475	1480	3,0 ^d	1,3 ^c	2,9 ^d	5,5 ^e	1,8 ^c	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	2,6 ^d	ND ^a	0,4 ^b	2,9 ^d	7,4 ^f	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a
82	γ-himalacheno	1484	1486	ND ^a	ND ^a	0,2 ^b	0,2 ^b	ND ^a	ND ^a	ND ^a	0,1 ^b	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a
83	α-zingibereno	1491	1490	3,0 ^b	3,3 ^b	9,7 ^g	5,5 ^d	6,7 ^e	14,0 ^j	7,8 ^f	11,8 ⁱ	10,3 ^g	10,9 ^h	3,4 ^b	3,0 ^b	10,8 ^h	4,6 ^c	8,2 ^f	3,1 ^b	5,4 ^d	4,0 ^c	2,0 ^a	6,4 ^e
84	biciclogermacreno	1494	1495	3,2 ^c	ND ^a	3,3 ^c	2,7 ^{d,e}	3,2 ^c	ND ^a	0,6 ^b	2,3 ^d	1,4 ^c	5,4 ^f	0,7 ^b	0,4 ^b	0,4 ^b	0,6 ^b	ND ^a	13,4 ⁱ	4,9 ^f	10,6 ^g	11,7 ^h	ND ^a
85	cis-α-bisaboleno	1495	1495	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	0,3 ^b	0,3 ^b	0,6 ^b	0,5 ^b	ND ^a	ND ^a	ND ^a	1,1 ^c	3,1 ^d	ND ^a
86	α-muroleno	1496	1495	ND ^a	1,7 ^{b,c}	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	1,5 ^b	1,5 ^b	5,5 ^f	4,9 ^c	3,0 ^d	1,0 ^b	1,1 ^b	2,6 ^{c,d}	2,1 ^c	0,8 ^b
87	(E,E)-α-farneseno	1501	1506	0,5 ^b	1,6 ^c	3,9 ^d	0,3 ^b	3,2 ^d	0,5 ^b	7,7 ^e	ND ^a	1,3 ^c	0,4 ^b	0,6 ^b	0,5 ^b	0,6 ^b	0,9 ^{b,c}	0,9 ^{b,c}	ND ^a	ND ^a	0,9 ^{b,c}	0,9 ^{b,c}	0,5 ^b
88	β-bisaboleno	1503	1506	1,4 ^c	2,7 ^d	ND ^a	1,7 ^c	1,4 ^c	0,8 ^{b,c}	4,4 ^e	0,2 ^b	1,6 ^c	2,3	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	1,1 ^c	0,6 ^{b,c}	0,7 ^{b,c}	ND ^a	ND ^a	ND ^a
89	γ-cadineno	1512	1512	1,0 ^{b,c}	0,5 ^b	1,3 ^c	0,5 ^b	1,6 ^c	ND ^a	3,1 ^d	1,5 ^c	1,5 ^c	10,8 ^e	0,7 ^b	0,6 ^b	1,6 ^c	1,6 ^c	2,5 ^d	1,9 ^{c,d}	1,1 ^{b,c}	2,9 ^d	2,2 ^{c,d}	1,5 ^c
90	β-sesquifelandreno	1515	1516	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	0,9 ^b	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a
91	δ-cadineno	1517	1522	1,7 ^c	1,8 ^c	4,0 ^d	1,7 ^c	2,2 ^c	4,7 ^d	0,3 ^b	0,3 ^b	3,3	ND ^a	0,1 ^b	ND ^a	0,1 ^b	0,2 ^b	2,4 ^c	0,1 ^b	ND ^a	0,3 ^b	0,4 ^b	0,1 ^b
92	trans-calameneno	1526	1526	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	1,8 ^d	1,9 ^d	ND ^a	ND ^a	0,4 ^b	ND ^a	0,2 ^b	0,2 ^b	1,0 ^c	ND ^a	0,6 ^{b,c}	0,4 ^b	0,4 ^b	0,2 ^b

Tabla 7.4. Continuación.

Pico	Compuesto ^a	Kl ^e _b	Kl ^e _c	% ^d																			
				Flor rosa y amarillo					Flor naranja y amarillo					Flor amarilla					Flor blanca				
				H	T	I	PE	AE	H	T	I	PE	AE	H	T	I	PE	AE	H	T	I	PE	AE
93	γ -bisaboleno	1530	1530	0,6 ^{b,c}	0,4 ^b	0,3 ^b	0,2 ^b	ND ^a	4,0 ^c	ND ^a	ND ^a	0,9 ^c	2,5 ^d	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	0,2 ^b	ND ^a	ND ^a
94	α -cadineno	1535	1535	0,6 ^c	0,7 ^c	0,5 ^c	0,3 ^{b,c}	ND ^a	0,1 ^b	0,1 ^b	ND ^a	0,2 ^b	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a
95	<i>cis</i> -sesquisabinenhidrato	1536	1539	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	0,2 ^b	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a
96	α -calacoreno	1539	1540	ND ^a	ND ^a	0,1 ^b	ND ^a	ND ^a	0,4 ^b	0,1 ^b	1,1 ^c	0,3 ^b	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	0,2 ^b	0,1 ^b	0,4 ^b
97	<i>cis</i> -nerolidol	1544	1546	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	1,0 ^b	ND ^a	0,7 ^b	0,6 ^b	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a
98	elemol	1548	1549	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	1,1 ^c	0,2 ^b	1,1 ^c	ND ^a	0,6 ^c	0,2 ^b	ND ^a	0,4 ^{b,c}	0,3 ^b	0,4 ^{b,c}
99	γ -calacoreno	1564	1558	ND ^a	ND ^a	0,3 ^b	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	0,2 ^b	0,2 ^b	0,4 ^b	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a
100	<i>cis</i> -3-hexenil benzoato	1566	1564	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	0,6 ^{b,c}	0,5 ^a	0,2 ^b	ND ^a	ND ^a	0,6 ^{b,c}	1,0 ^c	0,4 ^b	0,5 ^b
101	<i>trans</i> -nerolidol	1569	1567	ND ^a	0,3 ^b	0,9 ^c	0,2 ^b	ND ^a	0,5 ^b	0,6 ^{b,c}	ND ^a	0,3 ^b	ND ^a	ND ^a	ND ^a	0,2 ^b	ND ^a	0,9 ^c	0,7 ^{b,c}	0,4 ^b	0,6 ^{b,c}	0,3 ^b	2,1 ^d
102	óxido de cariofileno	1576	1578	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	1,4 ^b	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	1,1 ^b
103	ledol	1578	1574	ND ^a	ND ^a	0,1 ^b	0,2 ^b	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a
104	davanona	1586	1586	0,5 ^b	0,3 ^b	0,1 ^b	0,9 ^{b,c}	0,6 ^b	6,3 ^f	8,7 ^h	1,4 ^c	3,4 ^d	12,8 ^j	11,1 ⁱ	15,1 ^k	8,8	7,4 ^g	5,2 ^e	ND ^a	ND ^a	1,3 ^c	0,3 ^b	3,1 ^d
105	<i>trans</i> - β -elemenona	1593	1597	ND ^a	ND ^a	0,1 ^b	0,2 ^b	ND ^a	ND ^a	ND ^a	0,4 ^b	0,1 ^b	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	0,8 ^c	ND ^a	ND ^a	0,3 ^b	0,1 ^b	ND ^a
106	viridiflorol	1595	1595	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	0,5 ^c	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	0,1 ^b
107	α -humuleno epóxido II	1600	1600	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	0,5 ^c	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	0,1 ^b
108	óxido de humuleno	1601	1604	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	0,3 ^b	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a
109	spatulenol	1603	1605	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	4,0 ^c	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	0,5 ^b
110	dilapiol	1612	1613	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	1,6 ^d	ND ^a	0,3 ^b	0,2 ^b	0,6 ^c	ND ^a	ND ^a	0,5 ^c	0,8 ^c	0,2 ^b
111	1-epi-cubenol	1622	1622	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	1,5 ^d	ND ^a	ND ^a	1,2 ^d	0,1 ^b	0,5 ^c
112	sesquilavandulol	1629	1628	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	0,3 ^b	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	0,3 ^b	ND ^a	0,4 ^b	0,1 ^b	0,9 ^c	0,2 ^b	ND ^a	ND ^a	0,3 ^b	ND ^a
113	zingiberenol	1634	1635	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	1,6 ^c	ND ^a	ND ^a	0,2 ^b	ND ^a	1,5 ^c
114	τ -cadinol	1641	1640	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	0,1 ^b	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	0,3 ^b	0,9 ^c	0,1 ^b	0,2 ^b
115	cubenol	1645	1643	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	0,2 ^b	0,2 ^b	ND ^a	0,2 ^b	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	0,1 ^b	ND ^a	0,6 ^c	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a
116	α -muurolol	1646	1646	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	0,3 ^b	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	0,2 ^b	ND ^a	0,1 ^b	0,2 ^b	1,0 ^c	0,1 ^b	0,2 ^b	0,4 ^b	0,2 ^b	0,5 ^b
117	α -cadinol	1652	1653	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	1,6 ^c	ND ^a	ND ^a	0,4 ^b	ND ^a	1,2 ^c
118	cariofilenol II	1655	1656	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	0,3 ^b	ND ^a	1,2 ^c
119	No Identificado	1661	-	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	0,7 ^c	0,1 ^b	ND ^a	0,3 ^b	0,2 ^b	ND ^a
120	5-isocedranol	1664	1665	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	0,4 ^b	0,1 ^b	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	0,9 ^c	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a
121	β -sinensal	1674	1643	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	0,2 ^b	ND ^b	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	0,6 ^c	0,1 ^b	0,2 ^b	0,6 ^c	0,2 ^b	ND ^a
122	farnesol	1686	1682	ND ^a	ND ^a	0,1 ^b	0,1 ^b	0,6 ^b	ND ^a	2,0 ^c	0,6 ^b	0,5 ^b	ND ^a	ND ^a	ND ^a	0,1 ^b	ND ^a	0,6 ^b	ND ^a	ND ^a	0,4 ^b	ND ^a	0,3 ^b

Tabla 7.4. Continuación.

Pico	Compuesto ^a	Kl ^e ^b	Kl ^c ^c	% ^d																				
				Flor rosa y amarillo					Flor naranja y amarillo					Flor amarilla				Flor blanca						
				H	T	I	PE	AE	H	T	I	PE	AE	H	T	I	PE	AE	H	T	I	PE	AE	
123	acetato de longiborneol	1687	1687	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	0,7 ^c	ND ^a	ND ^a	0,2 ^b	0,2 ^b	0,1 ^b	
124	germacrona	1702	1696	ND ^a	ND ^a	0,1 ^b	0,2 ^b	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	0,5 ^c	ND ^a	ND ^a	0,1 ^b	ND ^a	0,5 ^b	
125	No Identificado	1716	-	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	0,4 ^b	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	
126	farnesal	1740	1737	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	6,2 ^d	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	0,5 ^c	ND ^a	ND ^a	0,1 ^b	ND ^a	ND ^a	
127	No Identificado	1745	-	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	0,2 ^b	ND ^a	4,9 ^c	
128	No Identificado	1758	-	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	0,6 ^b	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	
129	No Identificado	1774	-	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	0,2 ^b	ND ^a	1,8 ^c	
130	isovalencenol	1796	1793	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	0,5 ^c	ND ^a	ND ^a	0,2 ^b	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	0,2 ^b	0,2 ^b	ND ^a	0,1 ^b	ND ^a	2,4 ^d	
131	sesquilandulil acetato	1806	1809	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	0,5 ^b	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	0,1 ^b	ND ^a	0,1 ^b	ND ^a	0,4 ^b	0,4 ^b	0,1 ^b	0,2 ^b	
132	<i>trans</i> -farnesil acetato	1815	1812	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	0,1 ^b	ND ^a	ND ^a	0,2 ^b	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	0,3 ^b	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	0,3 ^b	
133	neofitadieno	1830	1830	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	0,4 ^b	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	0,5 ^b	
134	No Identificado	1869	-	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	0,4 ^b	0,2 ^b	0,1 ^b	
135	farnesil acetona	1922	1921	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	1,2 ^c	ND ^a	ND ^a	0,9 ^c	ND ^a	0,4 ^b	
136	isofitol	1952	1949	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	2,5 ^c	ND ^a	ND ^a	0,5 ^b	0,1 ^b	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	0,2 ^b	ND ^a	ND ^a	0,3 ^b	ND ^a	0,1 ^b	
Total				100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	
% Compuestos Identificados				98,1	100,0	100,0	98,6	97,8	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	93,8	97,6	100,0	90,0	95,4	94,8
% Área Identificada				99,0	100,0	100,0	99,5	99,5	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	98,0	99,9	100,0	97,7	97,7	93,0
Volátiles terpenoides				51,6	54,3	94,0	74,8	62,3	94,9	95,2	94,6	93,1	99,7	83,6	62,0	92,8	89,3	87,5	78,6	56,7	82,9	85,2	85,3	
Monoterpenos hidrocarbonados				5,4	10,6	15,6	12,5	3,5	0,7	9,0	18,4	13,5	ND	16,9	10,6	11,3	12,4	1,3	9,0	7,1	4,9	11,0	26,4	
Monoterpenos oxigenados				3,8	5,0	7,7	9,3	0,1	0,1	11,4	17,0	3,1	ND	2,2	3,8	5,7	3,3	0,3	1,5	1,7	5,4	3,1	3,2	
Sesquiterpenos hidrocarbonados				41,9	38,2	69,3	51,1	48,3	87,0	63,5	56,0	72,1	87,0	51,8	31,4	65,1	65,2	62,0	66,6	46,2	64,2	68,6	39,5	
Sesquiterpenos oxigenados				0,5	0,6	1,4	1,9	10,4	7,0	11,3	3,3	4,4	12,8	12,7	16,3	10,7	8,4	23,8	1,5	1,7	8,4	2,5	16,2	
Volátiles fenilpropanoides/bencenoides				0,3	ND	0,3	0,1	ND	0,1	0,4	ND	0,2	ND	1,6	ND	0,3	0,2	0,6	ND	0,3	2,4	0,8	0,2	
Volátiles derivados de ácidos grasos				47,0	45,2	3,4	22,0	34,1	5,0	4,4	4,6	6,2	0,2	14,7	38,0	6,6	9,4	6,9	16,8	41,1	6,2	7,0	6,0	
Otros				0,2	0,4	2,3	2,6	3,1	ND	ND	0,8	0,5	ND	0,1	ND	0,3	1,0	2,9	4,4	1,9	6,2	4,5	1,5	

^a Identificados por GC-MS; ^b Índices de retención de Kovat's experimentales; ^c Índices de retención de Kovat's de literatura; ^d Cuantificados por GC-FID; H: Hojas; T: Tallos; I: Inflorescencias; PE: Planta Entera; AE: Aceite Esencial, letras distintas indican diferencias significativas del ANOVA con test Tukey (p<0,05); ND: Compuesto No Detectado; * Compuestos identificados también por comparación con estándares de Sigma-Aldrich.

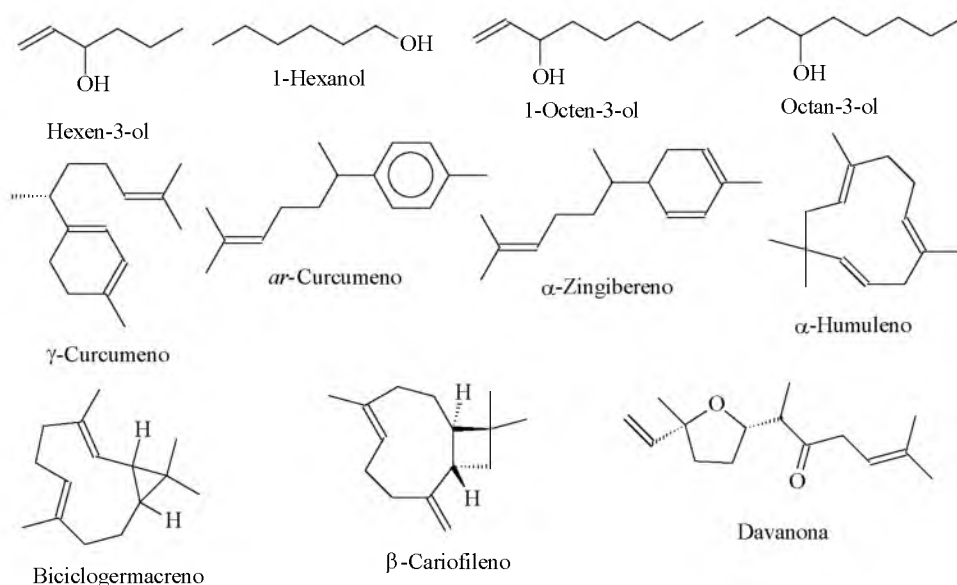


Figura 7.10. Componentes volátiles encontrados en las distintas variedades de *L. camara* estudiadas. ⁴

Comparando los CVV en el AE y por HS-SPME de *L. camara* de flores de color rosa y amarillo, se observaron algunas diferencias importantes:

- Ante la marcada diferencia en la cantidad de CVV hallados por HS-SPME en comparación con los encontrados en el AE, muchos de los componentes identificados por HS-SPME no se hallaron en el AE. Ellos fueron α -felandreno, *p*-cimeno, δ -3-careno, γ -terpineno, óxido de linalool, α -terpinoleno, linalool, 1,3,8-p-mentatrieno, alcohol β -feniletílico, *trans*-sabinol, *n*-hexil-iso-butirato, pinocarvona, borneol, terpinen-4-ol, α -terpineol, mirtenol, nerol, *cis*-carveol, pulegona, neral, geraniol, timol, hexil tiglato, *cis*-3-hexenil tiglato, δ -elemeno, bicicloelemeno, α -cubebeno, β -elemeno, β -cubebeno, *trans*-geranilacetona, γ -himalacheno, γ -bisaboleno, α -cadineno, ledol, *trans*- β -elemenona y germacrona.
- Algunos componentes identificados en el AE no se encontraron por HS-SPME. Ellos fueron óxido de cariofileno, óxido de humuleno, sesquilavandulol, cubenol, α -muurolol, farnesal, isovalencenol, sesquilavandulil acetato, *trans*-farnesil acetato e isofitol.
- Se observaron diferencias en las cantidades de algunos CVV, siendo los que mayores diferencias mostraron: hexen-3-ol, 1-hexanol, 1-octen-3-ol, *trans*- β -ocimeno, α -copaeno, β -bourboneno, α -humuleno, *allo*-aromadendreno, germacreno D y γ -cadineno.
- La proporción de terpenoides fue mayor por HS-SPME que en el AE.

⁴ Fuente de las estructuras químicas: Base de datos NIST: <http://webbook.nist.gov/chemistry/>

(e) Se encontró una cantidad notablemente mayor de monoterpenos por HS-SPME que en el AE, mientras que el porcentaje de sesquiterpenos fue aproximadamente el mismo por ambas técnicas. Sin embargo, en el AE se halló una concentración de sesquiterpenos oxigenados notablemente mayor que por HS-SPME.

(f) En el AE se halló una mayor concentración de CVV derivados de la vía LOX que por HS-SPME.

7.5.1.2- Diferencias entre la composición de inflorescencias, tallos y hojas

β -Cariofileno fue uno de los componentes mayoritarios de las hojas e inflorescencias, en cantidades similares. Sin embargo, el resto de CVV mayoritarios resultó diferente en cada caso: mientras que en inflorescencias γ -curcumeno fue el CVV de mayor proporción, en hojas lo fueron hexen-3-ol y 1-octen-3-ol. En los tallos los CVV mayoritarios fueron 1-hexanol y hexen-3-ol.

Comparando los resultados obtenidos en las diferentes partes aéreas de *L. camara* de flores de color rosa y amarillo, algunas de las diferencias y similitudes más importantes halladas fueron:

(a) Se encontró una diferencia importante en el número de compuestos producidos por cada parte de la planta, siendo las inflorescencias las que mostraron mayor cantidad de CVV (67 CVV frente a 53 en hojas y 48 en tallos).

(b) 2-Penten-1-ol y 1,8-cineol sólo se hallaron en las hojas.

(c) *Trans*-geranilacetona y α -muuroleno sólo estuvieron presentes en los tallos.

(d) β -Pino, *p*-cimeno, limoneno, α -canfolenal, *n*-hexil-iso-butilato, borneol, *cis*-carveol, neral, geraniol, *cis*-3-hexenil tiglat, δ -elemeno, isodieno, γ -himalacheno, α -calacoreno, γ -calacoreno, ledol, *trans*- β -elemenona, farnesol y germacrona fueron componentes exclusivos de las inflorescencias.

(e) Las inflorescencias tuvieron una proporción notablemente mayor de CVV de tipo terpenoide que hojas y tallos.

(f) En las inflorescencias se hallaron mayores concentraciones de monoterpenos que en los tallos y las hojas, al igual que en el caso de los sesquiterpenos, predominando los hidrocarbonados frente a los oxigenados en todos los casos.

(g) Las hojas y los tallos tuvieron concentraciones de CVV derivados de la vía LOX (GLV) notablemente mayores que las inflorescencias.

(h) La composición de CVV derivados del Shikimato fue aproximadamente la misma en las distintas partes de la planta.

7.5.2- *L. camara de flores de color naranja y amarillo*

7.5.2.1- Comparación entre el análisis por HS-SPME y del aceite esencial

A partir del análisis del AE de *L. camara* de flores de color naranja y amarillo, se hallaron 16 CVV diferentes, los cuales fueron identificados en su totalidad; mientras que por HS-SPME se encontraron 55 CVV, lográndose la identificación positiva de todos ellos también. Esta situación representó la caracterización de aproximadamente un 70 % más de CVV mediante el análisis por HS-SPME (Tabla 7.4). Otros investigadores reportaron obtener cantidades de volátiles mayores por HS-SPME en comparación con la hidrodestilación en una gran variedad de vegetales, donde las diferencias fueron explicadas por la pérdida de CVV debido a las altas temperaturas requeridas en el proceso de hidrodestilación en comparación con las empleadas por HS-SPME (Stashenko *et al.*, 2004; Mohammadhosseini *et al.*, 2013; Vázquez-Araújo *et al.*, 2013; Benyelles *et al.*, 2014; Mohammadhosseini & Nekoei, 2014; Zalousi *et al.*, 2016).

γ -Curcumeno, *ar*-curcumeno, β -cariofileno y α -zingibereno fueron componentes mayoritarios tanto en el AE como en el muestreo por HS-SPME, aunque en porcentajes diferentes. Sin embargo, en el AE se hallaron otros compuestos mayoritarios que por HS-SPME se encontraron en cantidades menores: davanona y γ -cadineno.

Comparando los CVV observados en el AE y por HS-SPME, se encontraron algunas diferencias destacables:

(a) Ante la marcada diferencia en la cantidad de CVV hallados por HS-SPME en comparación a los encontrados en el AE, muchos de los componentes identificados por HS-SPME no se encontraron en el AE: hexen-3-ol, *trans*- β -ocimeno, linalool, δ -cadineno y β -mirceno entre otros. Todos los CVV hallados en el AE fueron también hallados por HS-SPME.

- (b) Se observaron diferencias en las cantidades de algunos componentes, siendo los que mostraron mayores diferencias en sus porcentajes γ -curcumeno, biciclogermacreno, γ -cadineno y davanona.
- (c) La proporción de terpenoides en el AE fue aproximadamente la misma que por HS-SPME, aunque en el AE fue prácticamente debida a sesquiterpenos, mientras que por HS-SPME se encontró una cantidad importante de monoterpenos, además de sesquiterpenos.
- (d) El porcentaje de sesquiterpenos oxigenados fue notablemente mayor en el AE que por HS-SPME.
- (e) Por HS-SPME se encontró mayor concentración de CVV derivados de la vía LOX que en el AE.

7.5.2.2- Diferencias entre la composición de inflorescencias, tallos y hojas

γ -Curcumeno, *ar*-curcumeno, α -zingibereno y β -cariofileno fueron los componentes mayoritarios de hojas, tallos e inflorescencias, aunque en cantidades diferentes. Sin embargo, en el caso de los tallos, davanona también fue un componente mayoritario, aunque se encontró en menor proporción en las demás partes de la planta.

Comparando los resultados obtenidos en las diferentes partes aéreas de *L. camara* de flores de color naranja y amarillo, algunas de las diferencias y similitudes más importantes halladas fueron:

- (a) No se observaron grandes diferencias en el número de compuestos producidos por cada parte de la planta.
- (b) 1-Octen-3-ol, α -felandreno, γ -terpineno, pulegona, β -bourboneno y γ -bisaboleno sólo se hallaron en las hojas.
- (c) Octan-3-ol, 1,3,8-*p*-mentatrieno y *trans*-geranilacetona sólo estaban presentes en los tallos.
- (d) β -Pineno, α -terpinoleno, nerol, geranial, timol, *cis*-3-hexenil tigolato, γ -himalacheno, *trans*- β -elemenona, τ -cadinol, 5-isocedranol, β -sinensal, isovalencenol, *trans*-farnesil acetato e isofitol fueron componentes exclusivos de las inflorescencias.
- (e) Las cantidades de los CVV fueron en general diferentes en las distintas partes aéreas de las plantas estudiadas, como puede observarse, por ejemplo, en el caso de hexen-3-ol, *trans*- β -ocimeno, β -elemeno, γ -curcumeno y δ -cadineno, entre otros.

(f) Las cantidades de CVV tipo terpenoide fue aproximadamente la misma en las diferentes partes de la planta, aunque las inflorescencias y los tallos tuvieron una proporción de monoterpenos notablemente mayor que las hojas. El 94,0 % de los CVV de las hojas fueron sesquiterpenos, mientras que en tallos fue del 74,8 % y en inflorescencias, del 59,3 %.

(g) Las concentraciones de CVV de la vía LOX y del Shikimato fue aproximadamente la misma en las diferentes partes de la planta.

7.5.3- *L. camara de flores de color amarillo*

7.5.3.1- Comparación entre el análisis por HS-SPME y del aceite esencial

A partir del análisis del AE de *L. camara* de flores de color amarillo, se hallaron 65 CVV diferentes, 61 de los cuales fueron identificados (93,8 %), lo que corresponde al 98,0 % del área total del cromatograma; mientras que por HS-SPME se encontraron 60 CVV, lográndose la identificación positiva de todos ellos. Esta situación representó la caracterización de aproximadamente la misma cantidad de CVV en el AE y por HS-SPME (Tabla 7.4).

β -Cariofileno fue un componente mayoritario tanto en el AE como en el muestreo por HS-SPME, aunque en porcentajes diferentes. Sin embargo, por HS-SPME se hallaron otros compuestos mayoritarios que en el AE se encontraron en cantidades menores: γ -curcumeno y α -humuleno.

Comparando los resultados del AE y por HS-SPME, se encontraron algunas diferencias destacables:

(a) Aunque la cantidad de CVV hallados por HS-SPME no fue muy diferente que la encontrada en el AE, muchos de los componentes identificados por una técnica no se encontraron por la otra.

(b) Santolina trieno, β -bisaboleno, β -sesquifelandreno, *cis*-sesquisabineno hidrato, *trans*- β -elemenona, viridiflorol, α -humuleno epóxido II, spatulenol, 1-epi-cubenol, zingiberenol, α -cadinol, 5-isocedranol, β -sinensal, longiborneol acetato, germacrona, farnesal, isovalencenol, *trans*-farnesil acetato, neofitadieno, farnesil acetona e isofitol sólo se hallaron en el AE.

(c) Hexen-3-ol, α -tujeno, α -pineno, sabineno, β -mirceno, α -felandreno, α -terpineno, *trans*- β -ocimeno, γ -terpineno, óxido de linalool, isoterpinoleno, *trans*-sabinol, 2,6-(E,Z)-nonadienal,

pinocarvona, epoxilinalol, borneol, terpinen-4-ol, *cis*-3-hexenil butirato, α -terpineol, α -citral, *cis*-3-hexenil angelato, *cis*-3-hexenil tiglat, bicicloelemeno, isodieno, biciclogermacreno, *cis*- α -bisaboleno y *cis*-3-hexenil benzoato sólo se encontraron por HS-SPME.

(d) Se observaron diferencias en los porcentajes de algunos componentes, siendo los que mostraron mayores diferencias en sus cantidades 1-octen-3-ol, β -elemeno, *cis*-jasmona, α -humuleno, γ -curcumeno, *ar*-curcumeno y germacreno D.

(e) La proporción de terpenoides en el AE fue aproximadamente la misma que por HS-SPME, aunque la composición de CVV del AE fue prácticamente debida a sesquiterpenos, mientras que por HS-SPME se encontró una cantidad importante de monoterpenos, además de sesquiterpenos.

(f) El porcentaje de sesquiterpenos oxigenados fue notablemente mayor en el AE que por HS-SPME.

(e) Por HS-SPME se encontró una concentración de CVV derivados de la vía LOX ligeramente mayor que en el AE.

7.5.3.2- Diferencias entre la composición de inflorescencias, tallos y hojas

β -cariofileno, α -humuleno y davanona fueron los CVV mayoritarios tanto en hojas como en inflorescencias y tallos, aunque en porcentajes diferentes. Sin embargo, en las inflorescencias también fueron componentes mayoritarios, γ -curcumeno y α -zingibereno, los cuales se hallaron en cantidades menores tanto en los tallos como en las hojas. Del mismo modo, 1-octen-3-ol fue también un componente mayoritario en los tallos y las hojas, aunque en porcentajes distintos, mientras que en las inflorescencias se encontró en cantidades menores. Octan-3-ol también fue un CVV mayoritario en los tallos, aunque en las hojas e inflorescencias se encontró como componente menor.

Comparando los resultados obtenidos en las diferentes partes aéreas de *L. camara* de flores de color amarillo, algunas de las diferencias y similitudes más importantes fueron:

(a) Se observó una diferencia importante en el número de compuestos producidos por cada parte de la planta, siendo las inflorescencias las responsables de la mayor cantidad de CVV (56 frente a 46 en hojas y 40 en tallos).

- (b) La proporción de varios CVV fue diferente en las distintas partes aéreas de las plantas estudiadas, como puede observarse por ejemplo en el caso de hexen-3-ol, 1-octen-3-ol, octan-3-ol, *p*-cimeno, γ -terpineno, β -cariofileno, α -humuleno y davanona.
- (c) α -Pino y β -mirce solo se hallaron en las hojas.
- (d) 1-Hexanol, α -felandreno y *trans*-sabinol fueron componentes exclusivos de los tallos.
- (e) Octan-3-ona, *cis*- β -ocimeno, óxido de linalool, pinocarvona, aromandendreno, α -amorfino, γ -calacoreno, *trans*-nerolidol, cubenol, farnesol y sesquilandulil acetato solo se encontraron en las inflorescencias.
- (f) Las cantidades de CVV tipo terpenoide fue mayor en las inflorescencias y en las hojas que en los tallos. Aunque el porcentaje de monoterpenos fue aproximadamente el mismo en las diferentes partes de la planta, las inflorescencias tuvieron la mayor proporción de sesquiterpenos frente a las hojas y los tallos.
- (g) Las concentraciones de CVV derivados de la vía LOX fue notablemente mayor en los tallos que en las hojas e inflorescencias.

7.5.4- *L. camara de flores de color blanco*

7.5.4.1- Comparación entre el análisis por HS-SPME y del aceite esencial

A partir del análisis del AE de *L. camara* de flores de color blanco, se hallaron 77 CVV diferentes, de los cuales se identificaron 73 (97,8 %), lo que corresponde al 93,0 % del área total del cromatograma; mientras que por HS-SPME se encontraron 65 CVV, lográndose la identificación positiva de 62 de ellos (95,4 %), lo que corresponde al 97,7 % del área total del cromatograma. Esta situación representó la caracterización de aproximadamente un 16 % más de CVV en el AE (Tabla 7.4). Otros investigadores reportaron obtener cantidades de volátiles mayores en el AE que por HS-SPME, siendo estas inconsistencias probablemente debidas a las conversiones químicas que pudieron haber tenido lugar durante la hidrodestilación, en comparación con las que podrían ocurrir en la técnica de HS-SPME, la cual no implica un proceso agresivo como en el caso de la hidrodestilación (Demirci *et al.*, 2005; Huang *et al.*, 2009). Otra razón que podría explicar la discrepancia entre los datos químicos obtenidos es la

gran diferencia en la cantidad de material vegetal requerido para llevar a cabo cada técnica (Muselli *et al.*, 2009).

β -Cariofileno fue un CVV mayoritario tanto en el AE como en el muestreo por HS-SPME, aunque en concentraciones diferentes. Sin embargo, por HS-SPME también se halló biciclogermacreno como CVV mayoritario, el cual no se detectó en el AE.

Comparando los resultados del AE y por HS-SPME, se encontraron algunas diferencias destacables:

(a) Algunos de los componentes identificados en el AE no se encontraron por HS-SPME: santolina trieno, α -pineno, β -pineno, β -mirceno, α -felandreno, *cis*- β -ocimeno, *trans*-nerolidol, viridiflorol, α -humuleno epóxido II, spatulenol, *trans*-farnesil acetato y neofitadieno.

(b) Algunos de los componentes identificados por HS-SPME no se encontraron en el AE: 1-hexanol, octan-3-ona, *p*-cimeno, 2,6-(E,Z)-nonadienal, pinocarvona, *cis*-3-hexenil tigolato, γ -elemeno, *allo*-aromadendreno, biciclogermacreno, *cis*- α -bisaboleno, *trans*- β -elemenona, sesquilavandulol y β -sinensal.

(c) Se observaron diferencias en las concentraciones de algunos componentes, siendo los que mostraron mayores diferencias en sus cantidades hexen-3-ol, sabineno, α -terpineno, β -cariofileno, aromandendreno, γ -curcumeno, α -muuroleno y *trans*-nerolidol.

(d) La proporción de terpenoides en el AE fue aproximadamente la misma que por HS-SPME, aunque en el AE se encontró mayor cantidad de monoterpenos que por HS-SPME, siendo predominantemente de tipo hidrocarbonado en ambos casos. En el caso de los sesquiterpenos, se hallaron en mayor concentración por HS-SPME que en el AE.

(e) El porcentaje de sesquiterpenos oxigenados fue notablemente mayor en el AE que por HS-SPME.

(f) Las concentraciones de CVV derivados de la vía LOX y del Shikimato fue aproximadamente la misma por ambas técnicas.

7.5.4.2- Diferencias entre la composición de inflorescencias, tallos y hojas

β -Cariofileno y biciclogermacreno fueron los CVV mayoritarios tanto en hojas como en inflorescencias y tallos, aunque en cantidades diferentes. Sin embargo, en los tallos, octan-3-

ol fue el CVV encontrado en mayor proporción, el cual se halló en porcentajes menores en las hojas e inflorescencias.

Comparando los resultados obtenidos en las diferentes partes aéreas de *L. camara* de flores de color blanco, algunas de las diferencias y similitudes más importantes fueron:

(a) Se observó una diferencia importante en el número de compuestos producidos por cada parte de la planta, siendo las inflorescencias las responsables de la mayor cantidad de CVV (80, frente a 41 en hojas y 44 en tallos).

(b) Hexen-3-ol, 1-hexanol, α -cedreno y sesquilavandulol sólo se hallaron en las hojas.

(c) Isoterpinoleno sólo se encontró en los tallos.

(d) α -Tujeno, óxido de linalool, 2,6-(E,Z)-nonadienal, pinocarvona, epoxilinalol, terpinen-4-ol, timol, δ -elemeno, α -cubebeno, β -elemeno, *cis*-jasmona, β -cubebeno, *cis*- β -farneseno, *cis*- α -bisaboleno, (E,E)- α -farneseno, γ -bisaboleno, α -calacoreno, davanona, *trans*- β -elemenona, dilapiol, 1-epi-cubenol, zingiberenol, α -cadinol, cariofilenol II, farnesol, longiborneol acetato, germacrona, farnesal, farnesil acetona e isofitol fueron componentes exclusivos de las inflorescencias.

(e) Las cantidades de CVV fueron en general diferentes en las distintas partes aéreas de las plantas estudiadas, como puede observarse por ejemplo en el caso de 2-hexenal, 1-octen-3-ol, octan-3-ol, *p*-cimeno, γ -terpineno, *cis*-3-hexenil tigolato, aromandendreno, *ar*-curcumeno y biciclogermacreno.

(f) Las cantidades de CVV de tipo terpenoide fue mayor en las inflorescencias y en las hojas que en los tallos. Aunque el porcentaje de monoterpenos fue aproximadamente el mismo en las diferentes partes de la planta, las hojas e inflorescencias tuvieron la mayor proporción de sesquiterpenos que los tallos. Las inflorescencias tuvieron mayor porcentaje de sesquiterpenos oxigenados que las hojas y los tallos.

(g) Las concentraciones de CVV derivados de la vía LOX fue notablemente mayor en los tallos que en las hojas e inflorescencias.

(h) Las inflorescencias tuvieron mayor concentración de CVV derivados del Shikimato que los tallos y las hojas, donde no fueron detectados.

Al contrastar los metabolitos encontrados en la presente investigación con los de otros estudios de *L. camara*, se observan algunas diferencias importantes. En muchas de las

investigaciones documentadas, los CVV mayoritarios pertenecieron al grupo de los sesquiterpenos (Oyediji *et al.*, 2003; Romeu *et al.*, 2004; Sundufu & Shoushan, 2004; Sousa *et al.*, 2010), aunque los componentes principales no resultaron los mismos en todos los casos. Sin embargo, algunos investigadores encontraron especímenes de *L. camara* con mayor proporción de monoterpenos (da Silva *et al.*, 1999; Kasali *et al.*, 2004; Sonibare & Effiong, 2008; Benites *et al.*, 2009). Por ejemplo, en plantas de *L. camara* de Brasil, la composición de CVV fue principalmente debida a sesquiterpenos (Sousa *et al.*, 2012), mientras que en especímenes de Perú, predominaron los monoterpenos (Benites *et al.*, 2009). En este sentido es interesante un estudio realizado en plantas brasileñas colectadas en diferentes regiones del Amazonas. Las cultivadas en el estado de Amapá tenían como principales componentes al limoneno (16,5%), α -felandreno (16,4%), germacreno-D (13,2%), β -cariofileno (10,8%) y sabineno (8,9%), mientras que los componentes mayoritarios identificados en plantas del estado de Roraima fueron germacreno-D (28,4%), germacreno-B (9,1%) y β -cariofilleno (5,6%). Por otro lado, las del estado de Pará presentaron a β -cariofileno (5,9%), γ -curcumeno, *ar*-curcumeno (27,6%), α -zingibereno (19,2%), α -humuleno (10,6%) y β -curcumeno (4,7%) como principales constituyentes (da Silva *et al.*, 1999).

Si bien todos los especímenes estudiados en el presente trabajo tuvieron predominio de sesquiterpenos, la proporción de monoterpenos fue muy variable no sólo según el espécimen de *L. camara* estudiado, sino según el método de extracción utilizado (Tabla 7.4), tal como encontraron otros investigadores (Stashenko *et al.*, 2003). La cantidad de metabolitos secundarios volátiles reportados en la bibliografía para *L. camara* también es muy variable. Por ejemplo, en un estudio de plantas de Brasil se encontraron 22 CVV (Sousa *et al.*, 2012), mientras que en plantas de Colombia se hallaron 67 (Stashenko *et al.*, 2003). En este estudio la cantidad de volátiles determinados también fue muy variable (Tabla 7.4), diferencias que, además, dependieron del método analítico utilizado, tal como reportaron también otros investigadores (Stashenko *et al.*, 2003).

Estas diferencias en la diversidad de CVV se puede ver justificada por diversos factores tales como el ambiente de cultivo (Oyediji *et al.*, 2003), las condiciones climáticas, la región geográfica (Oyediji *et al.*, 2003; Sundufu & Shoushan, 2004; Jang *et al.*, 2011), la estación de cosecha (Oyediji *et al.*, 2003; Sundufu & Shoushan, 2004; Jang *et al.*, 2011), la constitución genética (Nickavar & Mojab, 2005), el proceso de desarrollo floral, que está muy relacionada con el estadio de desarrollo, su estatus nutricional y los niveles de estrés ambiental, entre otros (Caroprese Araque *et al.*, 2011). Sin embargo, estas diferencias no son causadas sólo por el origen de las especies, sino también por el método de extracción (Stashenko *et al.*, 2003). Por

ejemplo, se han reportado reacciones de hidrólisis, degradación térmica, reordenamientos moleculares y pérdida de componentes debido a las duras condiciones durante el proceso de hidrodestilación (Jang *et al.*, 2011), así como diferencias de afinidad de los recubrimientos de las fibras para SPME por los analitos volátiles (Stashenko *et al.*, 2003).

Es interesante destacar que β -cariofileno fue el sesquiterpeno identificado en el AE de diversos orígenes, aunque en cantidades muy variadas (6-35 %) (da Silva *et al.*, 1999; Ngassoum *et al.*, 1999; Randrianalijaona *et al.*, 2005; Benites *et al.*, 2009; Sousa *et al.*, 2012). En este trabajo, β -cariofileno se encontró en todos los especímenes estudiados aunque en concentraciones diferentes (Tabla 7.4).

Davanona es otro CVV interesante a considerar, ya que, en un estudio de plantas de Madagascar, fue un marcador presente en *L. camara* de flores de color rosa y amarillo en elevado porcentaje, y ausente de especímenes de flores de color naranja y amarillo (Randrianalijaona *et al.*, 2005). En este estudio, fue hallado en todas las plantas estudiadas aunque en concentraciones diferentes (Tabla 7.4), incluso en las de flores color naranja y amarillo.

Otro aspecto importante a destacar es que, en varios de los especímenes estudiados en el presente trabajo, se encontraron cantidades importantes de CVV derivados de la vía LOX (GLV y jasmonatos). Muy pocos investigadores reportaron la presencia de este tipo de CVV, aunque en cantidades menores (Stashenko *et al.*, 2003; Romeu *et al.*, 2004; Sonibare & Effiong, 2008). En este estudio, fue notable su proporción en los especímenes de flores de color rosa y amarillo (Tabla 7.4). Sin embargo, también se halló una gran variabilidad de este grupo de metabolitos en las distintas plantas estudiadas.

7.6- Comparación de la composición de volátiles en las especies de *Lantana* estudiadas

A partir de una evaluación de los datos de los CVV identificados en las especies de *Lantana* estudiadas, correspondientes a los análisis por HS-SPME de la mezcla de las partes aéreas combinadas de la planta, se pueden observar algunas similitudes y diferencias interesantes:

(a) De los 140 componentes identificados, sólo 7 de ellos se encontraron en todas las especies, aunque en cantidades diferentes: *cis*-3-hexenil tigolato, bicicloelemeno, β -elemeno, β -cariofileno, α -humuleno, *allo*-aromadendreno y biciclogermacreno.

(b) Los componentes principales de las distintas especies son diferentes, incluso entre los distintos especímenes de *L. camara* estudiados.

(c) El análisis de los CVV distintivos por especie permite resumir que:

- Los componentes mayoritarios de *L. balansae* son, además, exclusivos de ella, lo que los convierte en los marcadores más importantes de esta especie: *cis*-dihidrocarvona, *trans*-dihidrocarvona y α -bisaboleno. Otros componentes exclusivos de esta especie que se encontraron en menores porcentajes son: limoneno, alcanfor, *trans*-tagetona, isodihidrocarveol, carveol, *cis*-tagetenona, *trans*-tagetenona, carvona, isopiperitenona, piperitenona, eugenol, óxido de piperitenona, metileugenol, longifoleno, hidroxitolueno butilado, β -copaen-4- α -ol e isospatulenol.

- Los componentes encontrados exclusivamente en los especímenes de *L. camara* con flores de color rosa y amarillo fueron: δ -3-careno, *n*-hexil isobutirato, verbenona, *cis*-carveol, pulegona, geraniol, δ -elemeno, ledol y germacrona. Sin embargo, esta especie fue la que mayor contenido presentó de hexen-3-ol, 1-hexanol, 1-octen-3-ol, borneol, terpinen-4-ol y β -bourboneno, en comparación con las demás especies y variedades de *Lantana*.

- Los CVV hallados exclusivamente en especímenes de *L. camara* con flores de color naranja y amarillo estuvieron en concentraciones muy bajas, por lo que no serían aptos para su identificación: 5-isocedranol e isofitol. Sin embargo, esta especie fue la que mayor contenido mostró de linalool, γ -curcumeno, *ar*-curcumeno y α -zingibereno, en comparación con las demás especies y variedades de *Lantana*.

- Los componentes encontrados exclusivamente en especímenes de *L. camara* con flores de color amarillo fueron: α -pineno, *cis*-3-hexenil butirato, geranial, *cis*-3-hexenil angelato y *cis*-nerolidol. Sin embargo, esta especie fue la que mayor contenido presentó de α -humuleno, α -muuroleno y davanona, en comparación con las demás especies y variedades de *Lantana*.

- Los CVV encontrados exclusivamente en especímenes de *L. camara* con flores de color blanco fueron: dehidroaromadendreno, metil salicilato, elemol, 1-epi-cubenol, τ -cadinol, β -sinensal, longiborneol acetato y sesquilavandulil acetato. Sin embargo, esta especie fue la que mayor contenido presentó de β -cariofileno y *cis*-3-hexenil tiglatol, en comparación con las demás especies y variedades de *Lantana*.

- Los CVV encontrados exclusivamente en *L. grisebachii* fueron: *cis*-3-hexenil acetato, *trans*-2-hexenil acetato, *cis*- β -ocimeno, α -gurgujeno, β -selineno, ledeno, cadina-1,4-dieno, epizonareno, selina-3,7(11)-dieno, germacreno B, germacren-4-ol, carotol, α -cadinol,

valerenal y α -costol. Sin embargo, esta especie fue la que mayor contenido presentó de β -elemeno, γ -elemeno y α -amorfino, en comparación con las demás especies y variedades de *Lantana*.

En todas las especies de *Lantana* estudiadas, la presencia de elevadas cantidades de CVV del tipo terpenoide, especialmente sesquiterpenos, sugiere que el proceso biosintético principal es el que se origina a partir de la vía MVA (Capítulo 1), aunque en *L. balansae* se encontró una proporción importante de monoterpenos provenientes de la ruta biosintética vía MEP. Sin embargo, en algunos especímenes de *L. camara* estudiados, se encontró un porcentaje importante de volátiles de la vía LOX, que no se encontraron en *L. balansae* y en muy baja proporción en *L. grisebachii* (Tablas 7.2, 7.3 y 7.4).

Es importante considerar que, a partir de los resultados hallados en este estudio, no sería posible considerar lo que propusieron Sena Filho *et al.* (2010), de utilizar limoneno, citral (neral/geranial), carvacrol, β -mirceno, alcanfor y timol como marcadores químicos propios del género *Lippia* que ellos no encontraron en las plantas del género *Lantana* que estudiaron, ya que, excepto carvacrol, todos ellos fueron hallados en alguna o varias de las especies de *Lantana* estudiadas. Otros investigadores también hallaron alguno/s de dichos CVV en especies de *Lantana* de diverso origen (da Silva *et al.*, 1999; Ngassoum *et al.*, 1999; Stashenko *et al.*, 2003; Romeu *et al.*, 2004; Randrianalijaona *et al.*, 2005; Sousa *et al.*, 2010).

Cuando se realizó el análisis de PCA sobre los componentes presentes en proporción $> 0,5 \%$, se obtuvieron dos componentes principales, las cuales resumieron el 57,8 % de la varianza total (Figura 7.11). A partir de un análisis del gráfico se puede observar que, en el caso de *L. camara*, los especímenes con flores de color rosa y amarillo posee características más comunes con los que poseen flores de color naranja y amarillo que con las demás, mientras que los que tiene flores amarillas son más cercanos a los de flores blancas. Por otro lado, *L. grisebachii* y *L. balansae* son diferentes entre sí y de las demás.

La figura 7.12 presenta el dendograma correspondiente a la evolución del agrupamiento de conglomerados en función de la distancia Euclídea a las concentraciones de compuestos volátiles usando como criterio de clasificación las tres especies y variedades de *Lantana*. Fijando un criterio de corte arbitrario en la distancia 13,0 las especies *L. balansae* y *L. grisebachii* se separan entre sí y de las demás. *L. camara* se divide en dos grupos: especímenes con flores de color rosa y amarillo con los que poseen flores de color naranja y

amarillo, por un lado, y los especímenes con flores amarillas con los que poseen flores blancas por el otro.

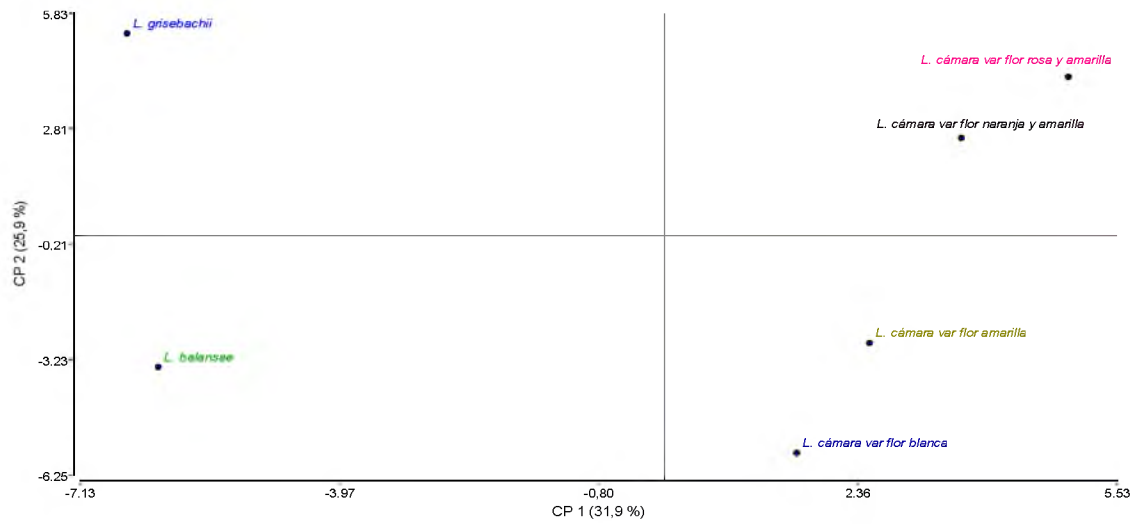


Figura 7.11. Gráfico de las componentes principales 1 y 2 rotados, resultantes del PCA sobre la matriz de correlación de los CVV presentes en las especies de *Lantana* estudiadas por HS-SPME.

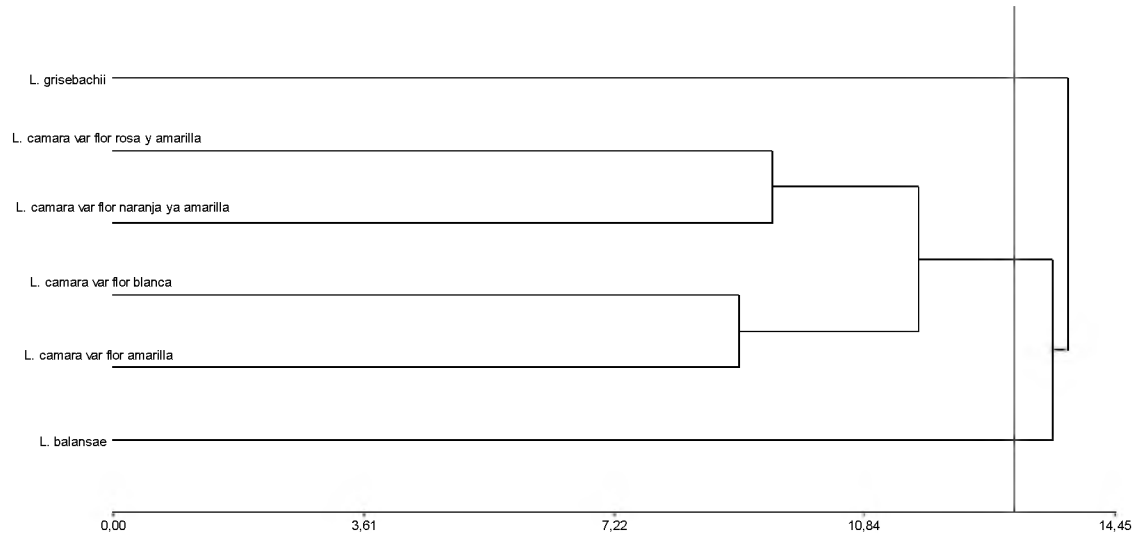


Figura 7.12. Dendrograma obtenido al realizar un Análisis por Conglomerados jerárquicos con el método de encadenamiento promedio y distancia Jaccard sobre la base de la variedad de CVV de las especies de *Lantana* estudiadas.

Capítulo 8

Caracterización de compuestos volátiles en semillas de *Coriandrum sativum* (Apiaceae). Estudio de la variación de la composición de volátiles en función del año de cosecha y del tiempo de almacenamiento.

8.1- Introducción.

8.2- Optimización del muestreo por HS-SPME.

8.2.1- Selección del tipo de fibra SPME.

8.2.2- Selección de la temperatura de trabajo.

8.2.3- Selección del tiempo de equilibrado del HS.

8.2.4- Selección del tiempo de exposición de la fibra en el HS.

8.3- Caracterización de compuestos volátiles en semillas de *Coriandrum sativum*.

8.3.1- Comparación entre el análisis por HS-SPME y del aceite esencial.

8.3.2- Estudio del cambio en la composición de volátiles de *C. sativum* durante el almacenamiento.

8.3.2.1- Estudio de los cambios en la composición de volátiles de semillas de coriandro en polvo durante el almacenamiento.

8.3.2.2- Estudio de los cambios en la composición de volátiles de semillas de coriandro enteras durante el almacenamiento.

8.3.3- Estudio de la composición de volátiles en *C. sativum* de diferentes años de producción.

8.1- Introducción

Coriandrum sativum L. (Figura 8.1), también denominado *cilandro*, *coriandro*, *perejil chino*, *culantro europeo* o *dania*, es una pequeña planta anual perteneciente a la familia Apiaceae (Umbelliferae), del orden de Apiales y nativa de la región Mediterránea (Argueta *et al.*, 1994; Asgarpanah & Kazemivash, 2012). Su nombre genérico *Coriandrum* [del griego *koriannon*, una combinación de *koris* (un insecto maloliente) y *annon* (un fragante anís)] alude al olor desagradable que produce sus frutos aún verdes, el cual se vuelve agradable al madurar (Uchibayashi, 2001); y su nombre específico, *sativum*, indica que es una planta cultivada (González-Palomares *et al.*, 2010).



Figura 8.1. *Coriandrum sativum* L. ¹

C. sativum pertenece a la familia del perejil, al igual que el anís, el eneldo y el hinojo, entre otros (Maroufi *et al.*, 2010). Los frutos (Figura 8.2) y las hojas poseen sabores muy distintos y, por lo tanto, se utilizan de maneras diferentes para condimentar los alimentos (Maroufi *et al.*, 2010). Las raíces se utilizan a menudo en la cocina tailandesa (Burdock & Carabin, 2009). Sus semillas se emplean en todo el mundo, enteras o molidas, como especia aromática (Arizio & Curioni, 2011).



Figura 8.2. Fruto de *Coriandrum sativum* L. ²

¹ Fuente <http://plants.thegrowingplace.com/12120014/Plant/18286/Cilantro>

² Fuente <https://gobotany.newenglandwild.org/species/coriandrum/sativum/>

Por otra parte, a nivel mundial se comercializan tres tipos diferentes de coriandro (Arizio & Curioni, 2011). El tipo marroquí es destinado especialmente a la obtención del grano para ser utilizado entero o molido, solo o en mezclas, como condimento alimenticio; el tipo ruso, de tamaño más pequeño y con alto contenido de aceites volátiles, es especialmente destinado a la obtención de aceite esencial y oleorresinas de amplio uso en la industria alimenticia, perfumera, tabaquera, cosmética y farmacológica; y, por último, el tipo hindú, grande y ovalado, que presenta y confiere un particular sabor al típico curry elaborado en la India y otros países asiáticos (Curioni *et al.*, 1995; Arizio *et al.*, 2010).

C. sativum es una hierba conocida desde la antigüedad, y es mencionada en antiguos escritos egipcios, sánscritos, griegos y latinos (Maroufi *et al.* 2010). Los registros antiguos revelan que el cilantro se utilizaba tanto para fines culinarios como medicinales (Diederichsen 1996, Maroufi *et al.* 2010) y fue una de las sustancias utilizadas por Hipócrates, y otros médicos griegos, con fines medicinales (Diederichsen 1996, Burdock y Carabin 2009).

Su actividad biológica ha sido ampliamente estudiada, demostrándose que el aceite esencial y varios extractos poseen actividad antibacteriana de amplio espectro (Baratta *et al.*, 1998; Elgayyar *et al.*, 2001; Delaquis *et al.*, 2002; Kubo *et al.*, 2004; Lo Cantore *et al.*, 2004; Nanasombat *et al.*, 2005; Saeed & Tariq, 2007; Matasyoh *et al.*, 2009; Innocent, 2011; Silva *et al.*, 2011b; Casetti *et al.*, 2012; Nazeruddin *et al.*, 2014), antifúngica (Saeed & Tariq, 2007; Begnami *et al.*, 2010; Silva *et al.*, 2011a; Darughe *et al.*, 2012; Soares *et al.*, 2012; de Almeida Freires *et al.*, 2014), antiparasitaria (Egualé *et al.*, 2007; Rondon *et al.*, 2011) y antiviral (Romeilah *et al.*, 2010) e insecticida (Pascual Villalobos, 2003; Chung *et al.*, 2012a, 2012b; Benelli *et al.*, 2013). Además, se ha probado su actividad antidiabética (Gray & Flatt, 1999; Sreelatha & Inbavalli, 2012), antihiperlipidémica (Lal *et al.*, 2004; Pirih *et al.*, 2012; Sreelatha & Inbavalli, 2012), anticancerosa (Rodríguez *et al.*, 2006; Omez-Flores *et al.*, 2010; Tang *et al.*, 2013), antimutagénica (Cortes-Eslava *et al.*, 2004), antioxidante (Wangenstein *et al.*, 2004; de Almeida Melo *et al.*, 2005; Samojlik *et al.*, 2010; Barros *et al.*, 2012; Darughe *et al.*, 2012; Divya *et al.*, 2012; Sreelatha & Inbavalli, 2012; Tang *et al.*, 2013), analgésica (Hashemi *et al.*, 2003; Paarakh *et al.*, 2016), antiinflamatoria (Hashemi *et al.*, 2003; Reuter *et al.*, 2008; Wu *et al.*, 2010; Nair *et al.*, 2013), antihipertensiva (Medhin *et al.*, 1986a, 1986b; Abeen *et al.*, 2009), cardioprotectiva (Patel *et al.*, 2012), gastroprotectiva (Al-Mofleh *et al.*, 2006; Zaidi *et al.*, 2012), moduladora gastrointestinal (Abeen *et al.*, 2009), reguladora del apetito (Nematy *et al.*, 2013), hepatoprotectora (Samojlik *et al.*, 2010; Pandey *et al.*, 2011), dermatoprotectiva (Park *et al.*, 2012; Hwang *et al.*, 2014; Park *et al.*, 2014), anticonceptiva (Al-Said *et al.*, 1987), preventiva de la deposición de plomo (Aga *et al.*, 2001) y aluminio (Aga *et*

al., 2002), desintoxicadora de metales pesados (Abidhusen *et al.*, 2012)), diurética (Aissaoui *et al.*, 2008; Jabeen *et al.*, 2009), ansiolítica (Emamghoreishi *et al.*, 2005; Emamghoreishi *et al.*, 2007; Mahendra & Bisht, 2011), reversora del déficit de memoria (Mani *et al.*, 2011), afectando positivamente la memoria y el aprendizaje (Zargar-Nattaj *et al.*, 2011; Cioanca *et al.*, 2013), antidepresiva (Sudha *et al.*, 2011), sedante (Emamghoreishi & Heidari-Hamedani, 2006; Rakhshandeh *et al.*, 2012; Gastón *et al.*, 2016), anticonvulsivante (Hossein-zadeh & Madanifard, 2005; Rakhshandeh *et al.*, 2012; Karami *et al.*, 2015) y neuroprotectora (Ghorbani *et al.*, 2012; Vekaria *et al.*, 2012).

En medicina tradicional las semillas (Figura 8.3) se utilizan como carminativo, diurético, antipirético, antinauseoso, en trastornos estomacales (Rajeshwari & Andallu, 2011), como antiflatulento, en el dolor de garganta (Krishnaraju *et al.*, 2005), como antidiabético (Otoom *et al.*, 2006; Jouad *et al.*, 2001), en el tratamiento de enfermedades renales y cardíacas (Jouad *et al.*, 2001), para el tratamiento de parásitos intestinales, del reumatismo y de la diarrea, como antiinflamatorio y espasmolítico (Nadeem *et al.*, 2013). Las hojas se usan para aumentar el apetito y en desórdenes gastrointestinales (Rahmatullah *et al.*, 2011).



Figura 8.3. Semillas de *Coriandrum sativum* L.³

Se ha estudiado también el potencial de *C. sativum* en la conservación de alimentos (Ramadan & Mörsel, 2004; Reddy *et al.*, 2005; Iqbal-Bhanger *et al.*, 2008; Nanditha *et al.*, 2008; Marangoni & de Moura, 2011; Darughe *et al.*, 2012; Michalczyk *et al.*, 2012), especialmente en cuanto a su capacidad para controlar la producción de aflatoxina (Meena & Sethi, 1994; Basilico & Basilico, 1999).

³ Fuente <https://www.latrementina.com/especias/137-cilantro-semilla.html>

Por lo visto anteriormente, *C. sativum* es un vegetal de gran importancia económica, siendo utilizado, además, como aromatizante en productos alimenticios, perfumes, cosméticos y fármacos (Darughe *et al* 2012). Argentina es un importante productor y exportador de coriandro tipo marroquí para América del Sur (Arizio y Curioni 2011, Burgos *et al* 2016), siendo este producto la única producción aromática y medicinal de nuestro País que continuó exportándose aún durante la década de 1990, cuando la eliminación de aranceles y el establecimiento de la convertibilidad, con la consecuente y creciente sobrevaluación de la moneda durante esos años, asestó un duro golpe para aquellas producciones aromáticas y medicinales tradicionales locales (Arizio y Curioni 2003). A partir de la crisis del año 2001 que impulsó la salida del plan de convertibilidad, con la lógica devaluación de la moneda y el esquema de políticas macroeconómicas que comenzaron a ejecutarse a partir del 2002/2003, las producciones aromáticas y medicinales de la Argentina volvieron a cobrar un nuevo impulso. Entre enero y agosto de 2007 y 2008, las principales exportaciones del sector aromático fueron manzanilla, orégano y coriandro (Maggi 2008).

Las condiciones agroedafoclimáticas de algunas regiones de Argentina permitieron el desarrollo de esta especie de clima templado, pudiéndose insertar en las rotaciones agrícolas de la región pampeana húmeda y subhúmeda en reemplazo del cultivo de trigo y, por ende, en el doble cultivo coriandro-soja (Arizio & Curioni, 2011). La agrotecnología de producción, cosecha y poscosecha es similar a la de los cultivos tradicionales, sembrándose entre mayo y junio y cosechándose desde principios a fines de noviembre-diciembre (Curioni & Arizio, 1997). Los rendimientos obtenidos (1.500 a 2.000 kg.ha⁻¹) son comparables a los de otros países productores, principalmente Canadá, aunque problemas de enfermedades o retrasos en la fecha de cosecha pueden generar importantes pérdidas de rendimientos (Dondo *et al.*, 2006; Smallfield, 2001; Holm & Slinkard, 2002).

A pesar de su importancia económica, no hay estudios sobre los efectos que las condiciones climáticas tendrían sobre la composición de CVV de coriandro producido en la región de Córdoba específicamente. La dinámica del desarrollo vegetal está determinada en parte por el clima, siendo la temperatura uno de los factores climáticos que mayor influencia tiene sobre el crecimiento y el desarrollo de los cultivos (Hoyos García *et al.*, 2012). Además, también son importantes factores como el fotoperiodo (Porter & Delecolle, 1988), la vernalización (Hoyos García *et al.*, 2012), la humedad y cantidad de precipitaciones (Zheljazkov *et al.*, 2008).

La temperatura afecta el crecimiento, desarrollo y rendimiento de las plantas, desempeñando un papel clave en la determinación del tiempo de siembra (Tiwari & Singh, 1993). Las temperaturas frías ralentizan el progreso hasta la madurez y las temperaturas cálidas apresuran

la madurez. Cada cultivo particular tiene una temperatura óptima para su iniciación y desarrollo, por lo que los cambios en esta temperatura óptima afectan su rendimiento, principalmente a través de modificaciones de sus procesos fisiológicos, incluyendo la fotosíntesis y la respiración (Sharma *et al.*, 2003). El coriandro es un cultivo sensible a la temperatura, siendo su temperatura óptima para la germinación y el crecimiento temprano, de 20-25 °C (Moniruzzaman *et al.*, 2015). El clima relativamente fresco durante el período vegetativo y el clima cálido durante la etapa reproductiva son ideales para su cultivo (Tiwari *et al.*, 2002).

La cantidad de energía térmica que un organismo acumula durante un período de tiempo se expresa a menudo como *suma térmica* o *grados de crecimiento diario* (GDD), variable que es utilizada para relacionar el crecimiento, desarrollo y madurez de la planta con la temperatura del medambiente (Parthasarathi *et al.*, 2013). Este índice ha sido aplicado en numerosos sistemas de producción de hortalizas para predecir la fecha de cosecha y el momento de siembras sucesivas (Qadir *et al.*, 2007; Hoyos García *et al.*, 2012). Aunque la GDD acumulada para las diferentes etapas de desarrollo es relativamente constante e independiente de la fecha de siembra, cada híbrido, variedad o cultivar de la especie, puede tener valores específicos para este parámetro (Zheljazkov *et al.*, 2008; Hoyos García *et al.*, 2012).

Los GDD por día se calculan con la ecuación 8.1, a partir de la temperatura máxima ambiental (TM), la temperatura mínima ambiental (Tm) y la temperatura base o umbral (Tb) (Parthasarathi *et al.*, 2013):

$$GDD = \frac{(TM + Tm)}{2} - Tb$$

Ecuación 8.1

Tb es la temperatura por debajo de la cual no se produce crecimiento, que varía para los cultivos de diferentes especies. Generalmente, los valores de temperaturas umbral son más altos para cultivos tropicales y más bajos para cultivos templados (Parthasarathi *et al.*, 2013).

En este capítulo se describe la optimización de una técnica de HS-SPME en cuanto a tipos de fibras, temperatura de extracción, tiempo de equilibrio y tiempo de extracción, para la posterior caracterización de CVV en semillas de *Coriandrum sativum* y el estudio del efecto del año de producción (en cuanto a diferencias climáticas) y del tiempo de almacenamiento sobre la composición de CVV de las semillas de coriandro.

8.2- Optimización del muestreo por HS-SPME

8.2.1- Selección del tipo de fibra SPME

La figura 8.4 muestra el efecto del tipo de fibra sobre el área total de picos y sobre el área de los picos de linalool, componente principal de *C. sativum*. El orden de eficiencia de la extracción de CVV determinada a partir del área total fue: DVB-CAR-PDMS \geq PDMS > PA > PDMS-DVB \geq CAR-PDMS, siendo la fibra DVB-CAR-PDMS la que mostró una extracción aproximadamente un 40% mayor que el resto de las fibras estudiadas. Cuando se realizó el análisis de varianza (ANOVA) con test de Tukey para las áreas totales (Tabla 8.1), no hubo diferencias significativas entre las fibras excepto entre CAR-PDMS y PDMS-DVB ni entre PDMS-DVB, PA y PDMS ($p < 0,05$). El área total obtenida con la fibra DVB-CAR-PDMS fue significativamente diferente del resto ($p < 0,05$), siendo la que mostró mayor capacidad extractiva de los componentes volátiles de *C. sativum*. El mismo comportamiento se observó para linalool, por lo tanto, se seleccionó dicha fibra para llevar a cabo los análisis de composición de CVV de semillas de coriandro.

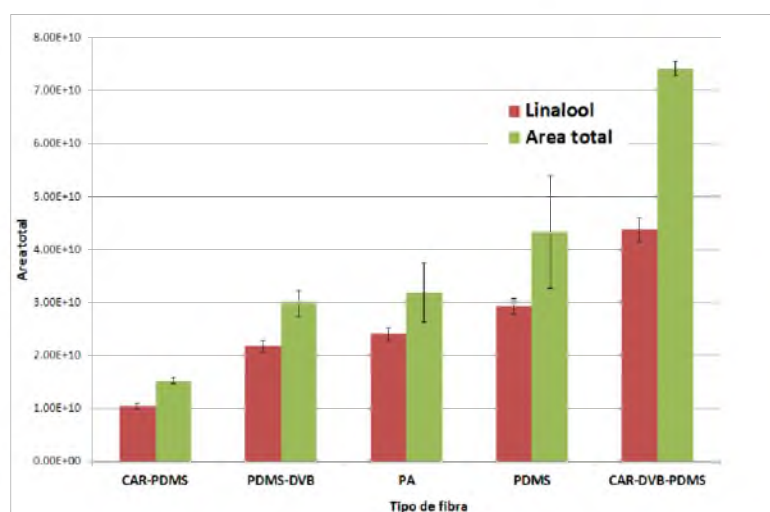


Figura 8.4. Efecto del tipo de fibra sobre el proceso de microextracción de componentes volátiles de *C. sativum*.

8.2.2- Selección de la temperatura de trabajo

La figura 8.5 muestra el efecto de la temperatura de microextracción sobre el área total de picos y sobre el área de linalool, componente principal de *C. sativum*. Como puede

observarse, el aumento de temperatura incrementa el área total de picos hasta los 40 °C, temperatura a partir de la cual empieza a disminuir notablemente. Esto estaría indicando que a temperaturas por encima de 40 °C la desorción de CVV desde la fibra se hace más importante que la ab/adsorción (Wercinski, 1999; Pawliszyn, 2012). Resultados similares se obtuvieron en la optimización de la técnica HS-SPME para la determinación de CVV de diversos tipos de muestras (Hamm *et al.*, 2003; Ma *et al.*, 2013; Vandendriessche *et al.*, 2013; Bianchin *et al.*, 2014).

Cuando se realizó un ANOVA sobre las áreas totales a las distintas temperaturas (Tabla 8.1), no se observaron diferencias significativas entre las temperaturas 30, 50 y 60 °C, pero si entre ellas y las demás temperaturas estudiadas. A partir de los resultados obtenidos, 40 °C fue seleccionada como la menor temperatura que produjo mayor eficiencia de extracción.

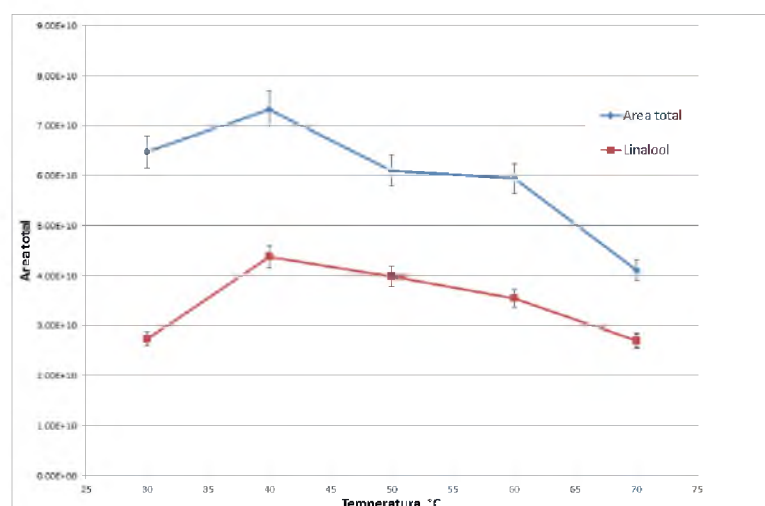


Figura 8.5. Efecto de la temperatura sobre el proceso de microextracción de componentes volátiles de *C. sativum*.

8.2.3- Selección del tiempo de equilibrado del HS

La figura 8.6 muestra el efecto del tiempo de equilibrado del HS sobre el área total de picos de los cromatogramas y sobre el área de linalool, componente principal de *C. sativum*. Como puede observarse, el incremento en el tiempo de equilibrio del HS no afecta significativamente al proceso de SPME. Cuando se realizó un análisis de varianza (Tabla 8.1), no hubo diferencias significativas en los diferentes tiempos estudiados, razón por la cual se optó por equilibrar el HS durante 10 minutos. Resultados similares se obtuvieron en otros estudios de optimización, con tiempos óptimos de 10 min de equilibrado del HS o incluso menores (Ma *et al.*, 2013).

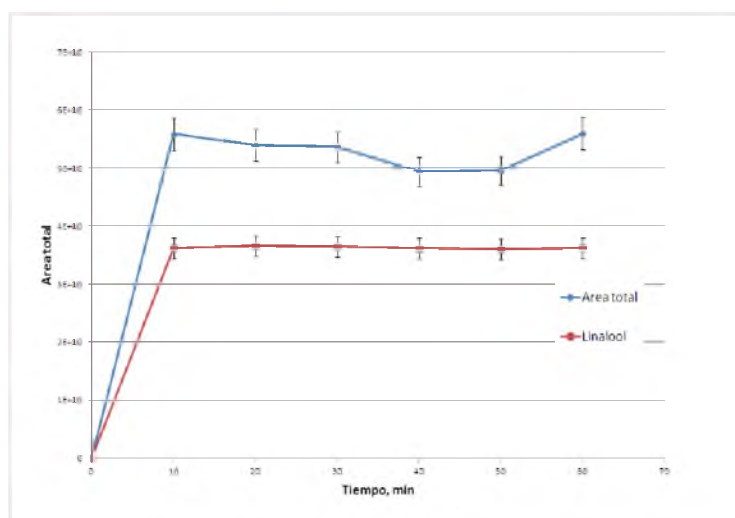


Figura 8.6. Efecto del tiempo de equilibrado del HS sobre el proceso de microextracción de componentes volátiles de *C. sativum*.

8.2.4- Selección del tiempo de exposición de la fibra en el HS

La figura 8.7 muestra el efecto del tiempo de exposición de la fibra en el HS sobre el proceso de microextracción. Al igual que en el caso del tiempo de equilibrado del HS, el incremento en el tiempo de exposición de la fibra en el HS no afecta significativamente al área total de picos de cromatograma ni al área del componente principal de *C. sativum*. Cuando se realizó un ANOVA (Tabla 8.1), no hubo diferencias significativas en las áreas de los diferentes tiempos estudiados, razón por la cual se optó por un tiempo de exposición de fibra de 10 minutos.

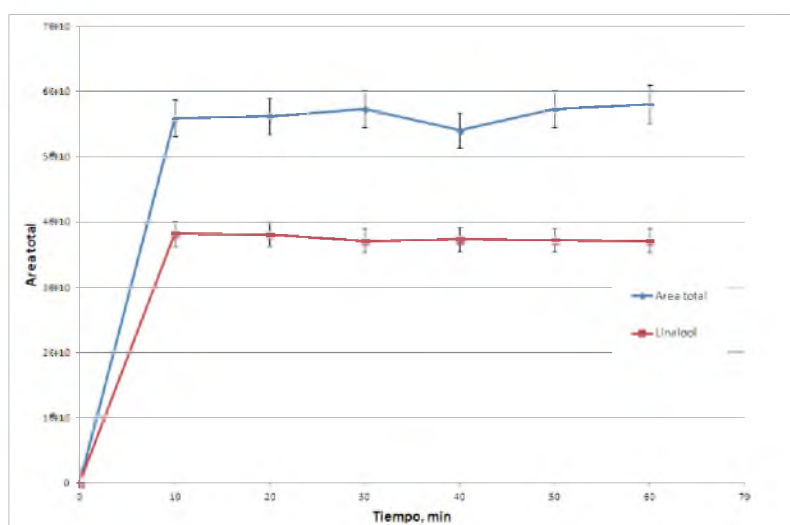


Figura 8.7. Efecto del tiempo de exposición de la fibra en el HS sobre el proceso de microextracción de componentes volátiles de *C. sativum*.

En la tabla 8.1 se muestran los valores de las áreas totales obtenidas con sus respectivas desviaciones estándares y los resultados del test Tukey ($p<0,05$) del ANOVA sobre los datos de la optimización de las condiciones experimentales para el análisis de semillas de *C. sativum*.

Tabla 8.1. Optimización de las condiciones experimentales para el análisis de semillas de *C. sativum*.

Variable	Categoría	Área total	SD ¹	Test Tukey ²
Tipo de fibra	CAR-PDMS	1,52E+10	5,9E+08	A
	PDMS-DVB	2,98E+10	2,4E+09	A, B
	PA	3,19E+10	5,5E+09	B
	PDMS	4,33E+10	1,1E+10	B
	DVB-CAR-PDMS	7,41E+10	1,4E+09	C
Temperatura (°C)	30	6,47E+10	2,1E+09	B
	40	7,33E+10	7,6E+08	C
	50	6,10E+10	2,3E+09	B
	60	5,94E+10	5,7E+09	B
	70	4,11E+10	1,5E+09	A
Tiempo de equilibrado del HS (min)	10	5,59E+10	4,4E+09	A
	20	5,40E+10	5,4E+09	A
	30	5,37E+10	4,9E+08	A
	40	4,94E+10	7,1E+08	A
	50	4,96E+10	1,0E+10	A
	60	5,60E+10	8,2E+09	A
Tiempo de exposición de la fibra (min)	10	5,59E+10	4,4E+09	A
	20	5,62E+10	2,4E+09	A
	30	5,74E+10	1,3E+09	A
	40	5,41E+10	1,8E+09	A
	50	5,74E+10	7,1E+07	A
	60	5,81E+10	1,3E+09	A

¹ Desviación estándar de determinaciones por triplicado.

² Letras distintas indican diferencias significativas ($p<0,05$).

A partir de los resultados de optimización, las condiciones adoptadas para el análisis de las semillas de coriandro fueron: fibra extractante: DVB-CAR-PDMS; temperatura de extracción: 40 °C; 10 minutos de equilibrio del HS y 10 minutos de exposición de la fibra en el HS.

8.3- Caracterización de compuestos volátiles en semillas de *Coriandrum sativum*

Se determinaron los CVV en semillas de *C. sativum* por las técnicas de hidrodestilación y HS-SPME. Los resultados se resumen en la tabla 8.2, y las estructuras químicas de algunos de los CVV hallados en mayor concentración se muestran en la figura 8.8.

Tabla 8.2. Componentes volátiles hallados en *C. sativum* por análisis del aceite esencial y HS-SPME, usando una fibra DVB-CAR-PDMS 50/30 μm ; temperatura de extracción de 40 $^{\circ}\text{C}$; 10 minutos de equilibrio del HS y 10 minutos de exposición de la fibra en el HS. Se muestran valores promedios de tres determinaciones, cuyos CV fueron menores al 5 %.

N° pico	tr ^a (min)	Compound ^b	KI ^d	KI ^e	A.E. ^f	% ^c HS-SPME
1	10,91	α -pineno	931	931	3,6	5,1
2	11,66	canfeno	944	944	0,2	0,5
3	13,27	β -pineno	973	969	0,5	0,8
4	14,36	mirreno*	992	993	0,3	2,1
5	16,35	<i>p</i> -cimeno	1023	1022	0,8	1,6
6	16,58	limoneno	1027	1025	1,2	3,8
7	17,50	<i>cis</i> -ocimeno	1040	1039	ND	0,4
8	18,18	<i>trans</i> - β -ocimeno	1051	1050	ND	0,5
9	18,64	γ -terpineno	1057	1056	4,9	11,9
10	20,74	α -terpinoleno	1089	1089	ND	0,8
11	21,73	linalool*	1103	1101	82,9	59,9
12	24,37	alcanfor	1141	1143	2,7	4,7
13	25,48	Citronelal	1156	1157	ND	0,5
14	26,98	4-terpineol	1178	1178	ND	0,2
15	27,98	α -terpineol	1192	1192	ND	0,3
16	28,65	dodecano	1201	1200	0,4	ND
17	32,64	<i>cis</i> -geraniol	1259	1258	ND	1,1
18	33,05	<i>trans</i> -geraniol (nerol)	1265	1270	ND	0,1
19	37,32	linalil propionato	1327	1324	ND	0,2
20	41,33	geranil acetato	1387	1383	1,8	1,4
21	42,28	tetradecano	1401	1400	0,6	4,1
Total					100,0	100,0
% Compuestos identificados					100,0	100,0
% Área identificada					100,0	100,0
Volátiles terpenoides					99,0	96,0
Monoterpenos hidrocarbonados					11,5	27,6
Monoterpenos oxigenados					87,4	68,4
Volátiles derivados de ácidos grasos					1,0	4,1

^a Tiempo de retención; ^b Identificado por GC-MS; ^c Cuantificado por GC-FID; ^d Índice de retención de Kovat's experimental; ^e Índice de retención de Kovat's de literatura; ^f Aceite Esencial; * KI Determinados usando estándar de referencia provisto por Sigma-Aldrich, Argentina. ND: Compuesto no detectado.

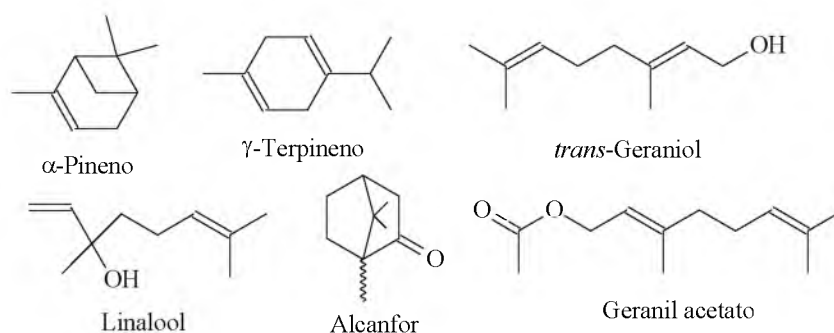


Figura 8.8. Componentes volátiles hallados en las semillas de *C. sativum* por análisis del aceite esencial y por muestreo mediante HS-SPME. ⁴

⁴ Fuente de las estructuras químicas: Base de datos NIST: <http://webbook.nist.gov/chemistry/>

Los CVV hallados en semillas de *C. sativum* son principalmente del tipo terpenoide, con un alto porcentaje de monoterpenos, especialmente los oxigenados, sin sesquiterpenos, y encontrándose un pequeño porcentaje de CVV provenientes de la vía LOX.

8.3.1- Comparación entre el análisis por HS-SPME y del aceite esencial

A partir del análisis del AE de semillas de *C. sativum*, se hallaron 12 CVV diferentes, todos identificados, mientras que por HS-SPME, se encontraron 20 componentes diferentes, también identificados en su totalidad. Esta situación representa la caracterización de un 40 % más de CVV mediante el análisis por HS-SPME (Tabla 8.2).

Tanto en el AE como en el muestreo por HS-SPME, el CVV mayoritario fue linalool, aunque en concentraciones diferentes.

Comparando los resultados del análisis del AE y por HS-SPME, algunas similitudes y diferencias destacables fueron:

- (a) Se identificó un mayor número de componentes minoritarios por HS-SPME, por lo tanto, muchos CVV hallados por HS-SPME no se encontraron en el AE: *cis*-ocimeno, *trans*- β -ocimeno, α -terpinoleno, citronelal, 4-terpineol, α -terpineol, *cis*-geraniol, *trans*-geraniol (nerol) y linalil propionato.
- (b) Dodecano fue el único CVV que se encontró en el AE y no por HS-SPME.
- (c) Se observaron algunas diferencias en las cantidades de α -pineno, mirceno, limoneno, γ -terpineno, linalool, alcanfor y tetradecano.
- (d) Las cantidades de monoterpenos oxigenados resultó mayor en el AE que por HS-SPME, y, concomitantemente, la concentración de monoterpenos hidrocarbonados fue mayor por HS-SPME.

Estas diferencias observadas entre los resultados obtenidos por HS-SPME y a partir del AE podrían explicarse por las pérdidas de CVV que pueden ocurrir en el proceso de hidrodestilación debido a las altas temperaturas requeridas en comparación con las empleadas por HS-SPME (Stashenko *et al.*, 2004; Mohammadhosseini *et al.*, 2013; Vázquez-Araújo *et al.*, 2013; Benyelles *et al.*, 2014; Mohammadhosseini & Nekoei, 2014; Zalousi *et al.*, 2016), además de las reacciones químicas que pueden ocurrir durante la hidrodestilación (Babu *et al.*, 2004; Babu & Kaul, 2007).

Muchos reportes mencionan que el rendimiento de aceite esencial de las semillas de cilantro es muy afectado por numerosos factores como el origen del cultivar, las condiciones climáticas y la posición geográfica de la región de crecimiento (Raal *et al.*, 2004), el cual puede variar desde 0,18 % hasta 2,2 % (Laribi *et al.*, 2015). Se han publicado también muchos informes sobre la composición química del aceite esencial de semillas de cilantro de diferentes partes del mundo, detectándose más de 35 compuestos diferentes en el aceite esencial de las semillas de coriandro originarias de Túnez (Msaada *et al.*, 2007), Bangladesh (Bhuiyan *et al.*, 2009), India (Singh *et al.*, 2006; Bankar *et al.*, 2011) y Pakistán (Anwar *et al.*, 2011), mientras que sólo 17 se han identificado en el aceite esencial de semillas de cilantro cultivadas en Argelia (Zoubiri & Baaliouamer, 2010). En general, se encontró que los perfiles químicos de los aceites esenciales de semillas de cilantro de la mayoría de las regiones estudiadas resultaron una fuente rica de monoterpenos oxigenados, siendo linalool el constituyente principal (Laribi *et al.*, 2015). El AE de semillas de cilantro tunecino contenía principalmente linalool (87,54 %) y *cis*-dihidrocarvona (2,36 %) (Msaada *et al.* 2007), mientras que las de Argelia, linalool (73,1 %), *p*-menta-1,4-dien-7-ol (6,51 %), α -pineno (3,41 %) y acetato de nerilo (3,22 %) (Zoubiri y Baaliouamer 2010). Por otro lado, en el AE de semillas de coriandro iraní, se detectaron linalool (40,9 a 79,9 %), acetato de nerilo (2,3 a 14,2 %), γ -terpineno (0,1 a 13,6 %) y α -pineno (1,2 a 7,1 %) (Nejad Ebrahimi *et al.*, 2010), mientras que en las de Bangladesh, linalool (37,65 %), geranil acetato (17,57 %) y γ -terpineno (14,42 %) (Bhuiyan *et al.*, 2009). En el caso del AE de semillas de coriandro de Pakistán, se encontraron linalool (69,60 %), geranil acetato (4,99 %), γ -terpineno (4,17 %), α -pineno (1,63 %), anetol (1,15 %) y *p*-cimeno (1,12 %) (Anwar *et al.*, 2011). De hecho, la composición química del AE de semillas de cilantro procedentes de Pakistán fue comparable con la observada en las semillas de India, compuesto por linalool (75,30 %), geranil acetato (8,12 %) y α -pineno (4,09 %) (Singh *et al.*, 2006; Bankar *et al.*, 2011). Las semillas de cilantro producidas en la zona este de Canadá contenían cantidades elevadas de linalool (64,00-84,60 %), alcanfor (3,40-6,20 %), α -pineno (1,20-3,20 %), felandreno (1,70-4,10 %), linalil acetato (2,40-3,30 %), limoneno (0,70-1,80 %), *p*-cimeno (0,50-1,30 %) y geranil acetato (0,90-1,60 %) (Zheljaskova *et al.*, 2008). El informe de Brasil mostró que los CVV principales de las semillas de coriandro fueron linalool (77,48 %), γ -terpineno (4,64 %), α -pineno (3,97 %), limoneno (1,28 %), geraniol (0,64 %) y E-2-decenal (0,16 %) (De Figueiredo *et al.*, 2004). En la composición de CVV en semillas procedentes de Argentina se encontró linalool (79,9 %), α -pineno (1,7 %), limoneno (1,0 %), γ -terpineno (4,8 %), *p*-cimeno (1,3 %), alcanfor (3,9 %), geranil acetato (1,2 %) y geraniol (2,6 %) (Bandoni *et al.*, 1998). Además, la composición química de los aceites esenciales aislados de dos variedades de *C. sativum* de Turquía (var.

vulgare Alef y var. *microcarpum* DC) fue cualitativamente similar, aunque el contenido de linalool fue mayor en la var. *microcarpum* (63,5-71,0 %) que en la var. *vulgare* (42,1-52,7 %) (Telci *et al.*, 2006). Como puede apreciarse, los CVV hallados en el presente trabajo son equiparables con los encontrados por otros investigadores en Argentina, Brasil y Canadá, aunque en cantidades diferentes en algunos casos. En este sentido, es importante considerar que el coriandro más utilizado para la cosecha de granos en Argentina es del “tipo marroquí” (*Coriandrum sativum* var. *sativum* L.), aunque existen poblaciones “acriolladas”, aún no hay variedades inscriptas en el Instituto Nacional de semillas (Paunero *et al.*, 2014).

Las variaciones del perfil químico de los AE de coriandro a través de las diferentes regiones se pueden entender si se tienen en cuenta todos los factores que influyen en su composición y rendimiento, esto es, las condiciones genéticas, climáticas, estacionales y geográficas, entre otros (Laribi *et al.*, 2015). Por otra parte, el análisis de la composición química del aceite esencial de las semillas de cilantro de Túnez mostró que los CVV principales de los frutos inmaduros fueron geranil acetato (46,27 %) y linalool (10,96 %), mientras que en los frutos maduros lo fueron linalool (87,54 %) y *cis*-dihidrocarvona (2,36 %). Por lo tanto, es posible sugerir que estas diferencias resultaron concomitantes con las modificaciones en el metabolismo secundario durante el proceso de maduración (Msaada *et al.*, 2009). Otros investigadores han estudiado el efecto, sobre la composición de CVV y rendimiento del AE de las semillas de coriandro, de la región geográfica de cultivo (Raal *et al.*, 2004), de la fecha de siembra (Zheljzskova *et al.*, 2008), de la etapa de desarrollo (Nurzyńska-Wierdak, 2013), de la interacción entre la región de crecimiento y las etapas de madurez (Msaada *et al.*, 2009) y del estrés abiótico como la sequía (Ghamarnia & Daichin, 2013; Hassan & Ali, 2014) o la salinidad (Neffati & Marzouk, 2008, 2009). Por otra parte, el rendimiento del aceite esencial y la composición de CVV también depende de las técnicas de extracción utilizadas (Benyoussef & Saibi, 2013; Laribi *et al.*, 2015).

8.3.2- Estudio del cambio en la composición de volátiles de *C. sativum* durante el almacenamiento

La composición de aceite esencial de cilantro es altamente sensible a las condiciones de almacenamiento y cambia con la duración del almacenamiento (Laribi *et al.*, 2015). De hecho, los cambios en la composición del aceite esencial de coriandro después del almacenamiento a la luz del día resultaron de las transformaciones químicas de los terpenos, incluyendo los procesos oxidativos iniciados por la luz (Laribi *et al.*, 2015). Correspondientemente, estas

modificaciones observadas dieron lugar a ciertas alteraciones en las características organolépticas del aceite esencial, así como en la acumulación de sustancias que alteraron su sabor y podrían resultar peligrosas para la salud humana (Laribi *et al.*, 2015). En consecuencia, los procesos oxidativos y de polimerización durante el almacenamiento traen como consecuencia pérdida de calidad (Turek & Stintzing, 2012).

No sólo el AE es sensible a los cambios durante el almacenamiento. La composición del aceite esencial obtenido de semillas en diferentes períodos de almacenamiento también puede cambiar (Misharina, 2001). Aunque hay numerosos reportes sobre los cambios en la composición de CVV durante el almacenamiento del aceite esencial de coriandro, los estudios de la estabilidad aromática de las semillas son muy escasos. Por esa razón se estudió el cambio en la composición de CVV en las semillas de coriandro trituradas y enteras.

8.3.2.1- Estudio de los cambios en la composición de volátiles de semillas de coriandro en polvo durante el almacenamiento

Semillas de coriandro trituradas se almacenaron durante 3 meses y se analizó la composición de CVV por HS-SPME a los tiempos 0; 15; 30; 45; 60 y 120 minutos, 24 horas y 3 meses (2352 hs). Los resultados se muestran en la tabla 8.3, y la figura 8.9 es un gráfico de puntos que muestra el área total de los cromatogramas obtenidos a los tiempos estudiados.

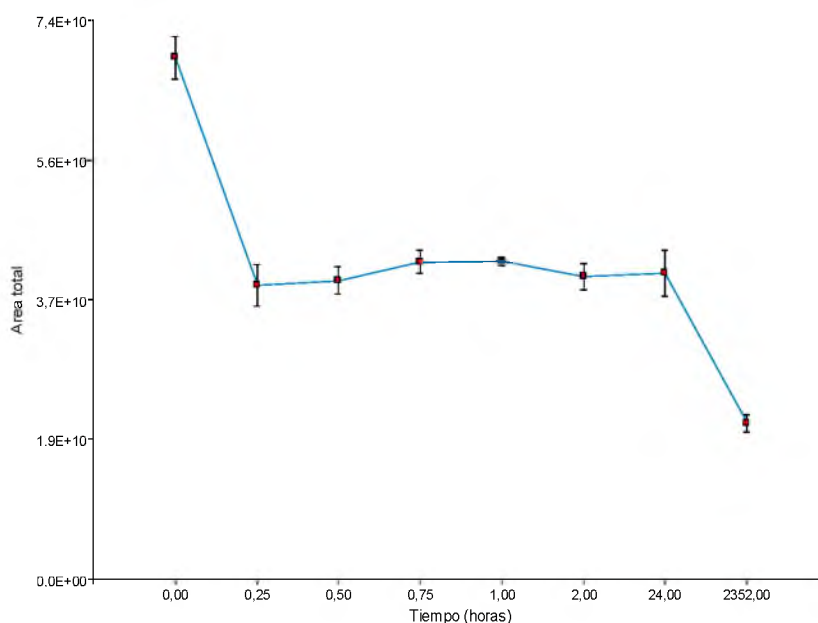


Figura 8.9. Áreas totales de los cromatogramas de semillas en polvo de *C. sativum* medidas por HS-SPME durante el almacenamiento.

Tabla 8.3. Efecto del almacenamiento sobre la composición de volátiles polvo de semillas de *C. sativum* por HS-SPME, usando una fibra DVB-CAR-PDMS 50/30 μm ; temperatura de extracción de 40 °C; 10 minutos de equilibrio del HS y 10 minutos de exposición de la fibra en el HS. Se muestran valores promedios de tres determinaciones, cuyos CV fueron menores al 5 %.

Compuesto	% ^{1, 2}							
	t=0	15 min	30 min	45 min	60 min	120 min	24 horas	3 meses
α -pineno	5,1 ^e	4,5 ^d	4,1 ^d	4,1 ^d	4,2 ^d	3,3 ^c	2,4 ^b	0,9 ^a
canfeno	0,5 ^{b,c}	0,6 ^c	0,7 ^c	0,6 ^c	0,2 ^a	0,4 ^{a,b}	0,3 ^{a,b}	0,1 ^a
β -pineno	0,8 ^c	0,3 ^a	0,4 ^{a,b}	1,0 ^c	0,7 ^c	0,7 ^{b,c}	0,8 ^c	0,3 ^a
mirreno	2,1 ^c	1,6 ^b	1,8 ^{b,c}	2,2 ^c	2,3 ^c	2,1 ^{b,c}	2,7 ^d	0,9 ^a
<i>p</i> -cimeno	1,6 ^e	0,9 ^{a,b}	1,0 ^{a,b,c,d}	1,3 ^d	1,1 ^{b,c,d}	1,3 ^{c,d}	1,0 ^a	1,1 ^{a,b,c}
limoneno	3,8 ^e	2,4 ^{b,c}	2,1 ^b	3,8 ^{d,e}	3,6 ^{d,e}	2,9 ^{c,d}	2,8 ^c	1,1 ^a
<i>cis</i> -ocimeno	0,4 ^{a,b}	0,1 ^{a,b}	0,4 ^{a,b}	0,2 ^{a,b}	0,1 ^a	0,6 ^b	0,3 ^{a,b}	0,1 ^a
<i>trans</i> - β -ocimeno	0,5	0,4	0,5	0,4	0,3	0,5	0,5	0,2
γ -terpineno	11,9 ^c	9,9 ^b	9,7 ^b	12,1 ^c	12,5 ^c	11,8 ^c	9,7 ^b	8,0 ^a
α -terpinoleno	0,8 ^b	0,7 ^b	0,8 ^b	0,9 ^b	0,9 ^b	0,5 ^a	0,6 ^a	0,3 ^a
linalool	59,9 ^a	69,6 ^e	69,4 ^e	64,2 ^b	66,1 ^c	68,0 ^d	70,5 ^f	78,9 ^g
alcanfor	4,7 ^b	4,5 ^b	4,9 ^b	4,9 ^b	4,5 ^b	4,6 ^b	5,3 ^b	3,0 ^a
citronelal	0,5	0,3	0,3	0,3	0,2	0,2	0,2	0,3
4-terpineol	0,2	0,3	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,3
α -terpineol	0,3	0,3	0,3	0,3	0,2	0,3	0,3	0,3
<i>cis</i> -geraniol	1,1 ^a	1,2 ^a	1,2 ^a	1,0 ^a	1,0 ^a	1,0 ^a	1,1 ^a	1,9 ^b
<i>trans</i> -geraniol (nerol)	0,1 ^b	0,1 ^b	0,1 ^b	0,3 ^a	ND ^c	ND ^c	ND ^c	ND ^c
linalil propionato	0,2 ^b	0,2 ^b	0,2 ^b	0,3 ^b	0,2 ^b	0,2 ^b	0,2 ^b	ND ^a
geranil acetato	1,4 ^{a,b,c}	2,0 ^d	1,8 ^{c,d}	1,9 ^{b,c,d}	1,4 ^a	1,4 ^{a,b}	1,2 ^a	2,2 ^d
tetradecano	4,1 ^c	0,2 ^b	0,1 ^b	0,1 ^b	0,1 ^b	ND ^a	ND ^a	ND ^a
Cociente entre γ -terpineno y <i>p</i> -cimeno	7,4	11	9,7	9,3	11,4	9,1	9,7	7,2

¹ Cuantificado por GC-FID; ² Letras distintas indican diferencias significativas cuando se realiza un ANOVA con test Tukey ($p < 0,05$). ND: Compuesto no detectado.

La figura 8.9 muestra como disminuyen drásticamente los CVV totales de las semillas después de los primeros 15 minutos de trituradas, cantidad que se mantiene aproximadamente constante incluso hasta 24 horas después. La disminución de CVV después de 3 meses de almacenamiento no es tan drástica como en los primeros 15 minutos. Esto es coincidente con otros reportes donde los frutos de cilantro molidos experimentaron una rápida pérdida de volátiles y un marcado deterioro organoléptico (Parthasarathy & Zachariah, 2008), aunque en este estudio, se evaluaron los cambios producidos en las primeras horas de procesados los granos. Esto implica que, al perder tan pronto la intensidad aromática, no sería recomendable su comercialización en forma de polvo.

La tabla 8.3 muestra como cambian las cantidades de los CVV del polvo de las semillas de coriandro durante el almacenamiento. La mayoría de ellos mantienen sus concentraciones aproximadamente constantes (con respecto al área total), o se reducen levemente, excepto α -pineno, mirreno, limoneno, γ -terpineno y tetradecano, que disminuyen notablemente, a la vez que la concentración de linalool aumenta.

Un indicador de degradación de las semillas de coriandro es la relación entre γ -terpineno y *p*-cimeno (Bandoni *et al.*, 1998; Paunero *et al.*, 2014), ya que el análisis de las muestras envejecidas mostró una importante disminución de los contenidos de γ -terpineno, y un aumento significativo en *p*-cimeno en comparación con los aceites típicos. Las relaciones entre γ -terpineno y *p*-cimeno fueron muy diferentes en las muestras frescas (mayores a 1,2) y envejecidas (menores a 1). El cociente entre γ -terpineno y *p*-cimeno se mantuvo dentro de los valores típicos de las muestras frescas, por lo que el polvo de semillas no llegó a degradarse durante el tiempo que duró el estudio.

8.3.2.2- Estudio de los cambios en la composición de volátiles de semillas de coriandro enteras durante el almacenamiento

Semillas de coriandro enteras se almacenaron en silobolsa durante 12 meses y se analizó la composición de CVV por HS-SPME a los tiempos 0 (recién cosechadas); 15 días; 3; 9; 10 y 12 meses. Los resultados se muestran en la tabla 8.4, y la figura 8.10 es un gráfico de puntos que muestra el área total de los cromatogramas obtenidos a los tiempos estudiados.

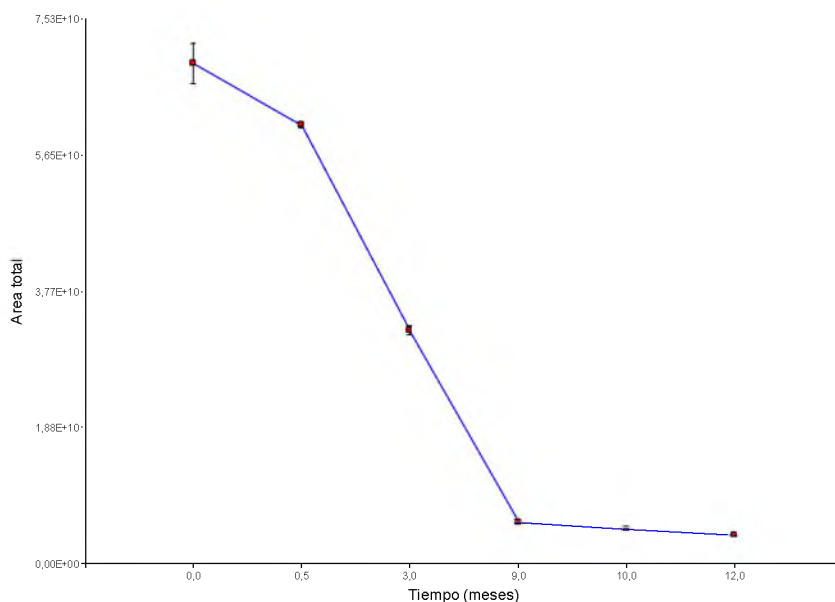


Figura 8.10. Áreas totales de los cromatogramas de semillas enteras de *C. sativum* medidas por HS-SPME durante el almacenamiento en silobolsa.

Tabla 8.4. Efecto del almacenamiento en silobolsa sobre la composición de volátiles de semillas enteras de *C. sativum* por HS-SPME, usando una fibra DVB-CAR-PDMS 50/30 μm ; temperatura de extracción de 40 °C; 10 minutos de equilibrio del HS y 10 minutos de exposición de la fibra en el HS. Se muestran valores promedios de tres determinaciones, cuyos CV fueron menores al 5 %.

Compuesto	% ^{1,2}					
	t=0	15 días	3 meses	9 meses	10 meses	12 meses
α -pineno	5,1 ^d	4,3 ^c	3,6 ^b	3,5 ^b	2,1 ^a	2,2 ^a
canfeno	0,5 ^b	0,1 ^a	0,2 ^a	0,3 ^a	0,1 ^a	0,2 ^a
β -pineno	0,8 ^b	0,3 ^a	0,4 ^a	0,6 ^a	0,5 ^a	0,6 ^a
mirreno	2,1 ^b	2,6 ^b	0,9 ^a	1,2 ^a	0,9 ^a	1,5 ^a
<i>p</i> -cimeno	1,6	1,3	1,7	1,9	1,6	1,9
limoneno	3,8 ^c	2,2 ^b	1,4 ^a	1,7 ^a	1,3 ^a	1,7 ^a
<i>cis</i> -ocimeno	0,4 ^c	0,5 ^c	0,1 ^b	ND ^a	ND ^a	ND ^a
<i>trans</i> - β -ocimeno	0,5 ^c	0,7 ^c	0,2 ^b	ND ^a	ND ^a	ND ^a
γ -terpineno	11,9 ^c	8,4 ^b	8,0 ^{a,b}	8,2 ^{a,b}	7,6 ^a	8,3 ^{a,b}
α -terpinoleno	0,8 ^b	0,8 ^b	0,4 ^a	0,4 ^a	0,3 ^a	0,5 ^a
linalool	59,9 ^a	65,9 ^b	73,2 ^c	74,3 ^d	77,1 ^f	75,3 ^e
alcanfor	4,7 ^c	5,1 ^c	3,6 ^b	3,1 ^{a,b}	3,2 ^a	3,1 ^a
citronelal	0,5 ^b	0,2 ^{a,b}	0,3 ^{a,b}	0,2 ^{a,b}	0,3 ^{a,b}	0,3 ^a
4-terpineol	0,2	0,4	0,2	0,2	0,3	0,2
α -terpineol	0,3 ^b	0,6 ^b	0,3 ^b	0,3 ^b	0,4 ^b	ND ^a
<i>cis</i> -geraniol	1,1 ^a	2,9 ^d	2,0 ^c	1,5 ^b	1,5 ^b	1,6 ^b
<i>trans</i> -geraniol (nerol)	0,1 ^b	0,3 ^b	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a
linalil propionato	0,2 ^b	0,5 ^b	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a
geranil acetato	1,4 ^a	2,7 ^b	3,4 ^c	2,6 ^b	2,8 ^b	2,8 ^b
tetradecano	4,1 ^c	0,3 ^b	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a
Cociente entre γ -terpineno y <i>p</i> -cimeno	7,4	6,5	4,7	4,3	4,8	4,4

¹ Cuantificado por GC-FID; ² Letras distintas indican diferencias significativas cuando se realiza un ANOVA con test Tukey ($p < 0,05$). ND: Compuesto no detectado.

La figura 8.10 muestra como disminuyen los CVV totales de las semillas enteras después de nueve meses de almacenamiento, cantidad que luego se mantiene aproximadamente constante hasta los 12 meses. Esto es coincidente con otros reportes que encontraron que los granos enteros de coriandro se pueden almacenar durante un período mayor que el polvo de las semillas. Sin embargo, cuando la fruta se daña o rompe durante el almacenamiento se acelera el deterioro de las mismas (Parthasarathy & Zachariah, 2008). En este caso, también se observó que las semillas enteras conservan sus propiedades aromáticas durante un período de tiempo mayor que las trituradas. Por ejemplo, comparando las áreas totales de los cromatogramas obtenidos luego de tres meses de almacenamiento, las semillas tuvieron aproximadamente un 30 % más CVV que las trituradas.

La tabla 8.4 muestra, además, como cambian las cantidades de CVV de las semillas durante el almacenamiento. La mayoría de ellos mantienen sus concentraciones aproximadamente constantes (con respecto al área total), o se reducen levemente, excepto α -pineno, limoneno,

γ -terpineno y tetradecano, los cuales disminuyen notablemente, a la vez que las cantidades de linalool y geranil acetato aumentan. Por otra parte, el cociente entre γ -terpineno y *p*-cimeno se mantuvo dentro de los valores típicos de las muestras frescas, por lo que las semillas almacenadas en silobolsa durante un año no llegaron a degradarse aunque sufrieron pérdida de volátiles (Bandoni *et al.*, 1998, Paunero *et al.*, 2014).

8.3.3- *Estudio de la composición de volátiles en C. sativum obtenidas en diferentes años de producción*

Los años de producción de coriandro estudiados (2010; 2011 y 2012) tuvieron condiciones climáticas diferentes. En cuanto a lluvia caída anual, 2011 fue el año más seco de los tres estudiados, presentando un total de 635,3 mm/m², frente a 1063,3 mm/m² en el año 2010 y 870,2 mm/m² en el año 2012. De los meses correspondientes al desarrollo de los cultivos (junio a diciembre), agosto fue el mes más seco en 2010 (0 mm/m²), mientras que en 2011 fue setiembre (1,0 mm/m²), y junio-julio en 2012 (0 mm/m²). En 2010, la precipitación total para los meses de junio a diciembre fue de 174,8 mm/m²; 344,5 mm/m² en 2011 y 311,4 mm/m² en 2012 (Tabla 8.5). La humedad relativa promedio anual en 2010 fue 58,1 %, en 2011, 55,5 % y en 2012, 59,7 %. Con respecto a la temperatura, en el año 2010 la media anual fue de 17,4 °C, con una máxima y mínima promedio de 25,5 y 11,3 °C respectivamente; en el año 2011, la media fue de 17,9 °C, con una máxima y mínima promedio de 26,3 y 11,6 °C respectivamente; finalmente, en el año 2012, la media fue de 18,2 °C, con una máxima y mínima promedio de 26,5 y 11,8 °C respectivamente. La tabla 8.5 muestra los datos meteorológicos de promedios para los meses junio a noviembre de los años de producción estudiados.

Tabla 8.5. Registro meteorológico de Córdoba durante los meses de cultivo de *C. sativum* en los años estudiados. Se muestran valores promedios.⁵

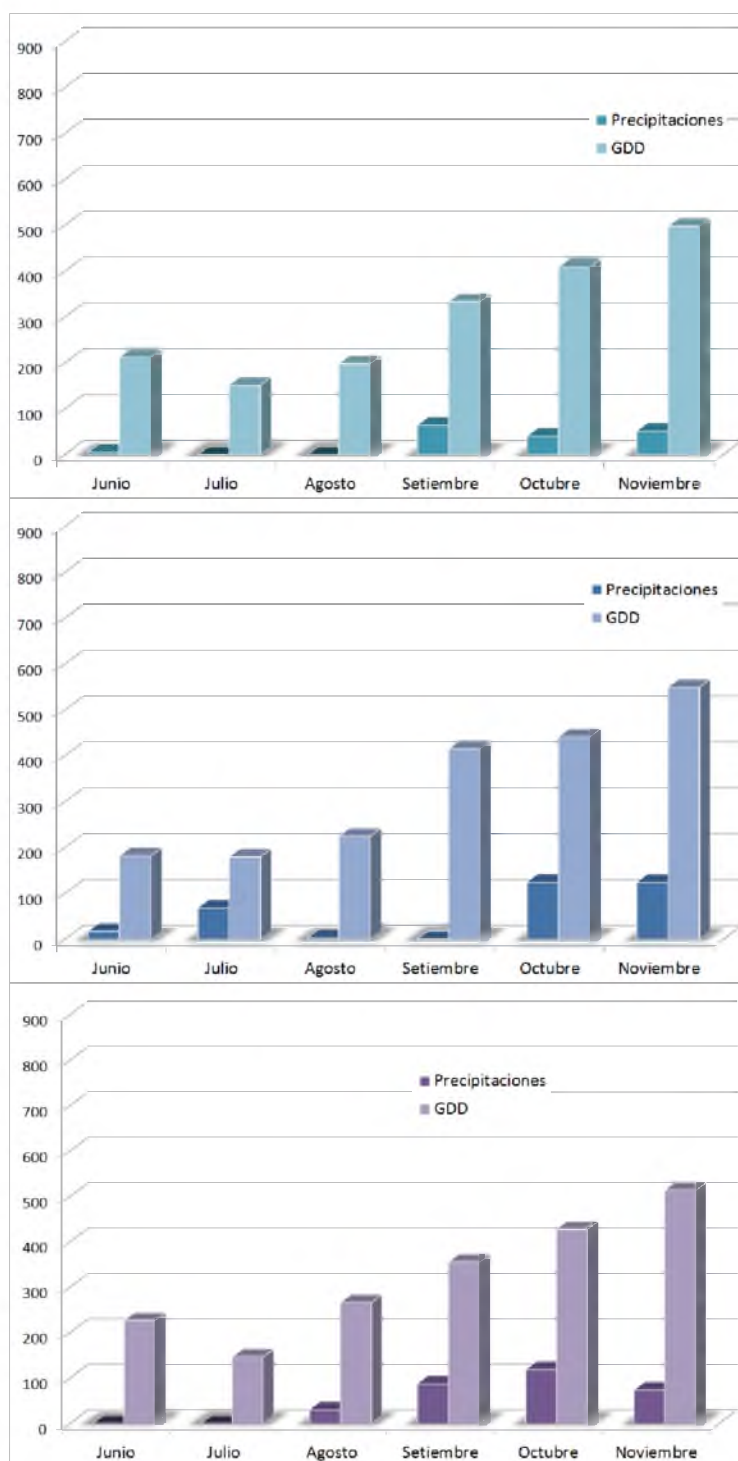
Año 2010						
Mes	T^a	TM^b	Tm^c	PA^d	H^e	PP^f
Junio	11,4	20,1	5,1	1018,6	60,4	5,6
Julio	9,5	18,6	2,3	1019,6	47,6	0,2
Agosto	11,5	19,9	4,9	1020,5	46,4	0
Setiembre	15,3	24,1	8,7	1016,2	52,5	64,5
Octubre	17,2	25,8	10,6	1015,8	53,2	40,6
Noviembre	20,7	29,4	13,8	1012,6	49,9	51,8
Diciembre	24,4	32,9	17,6	1007,9	48,0	11,94
Año 2011						
Junio	10,5	19,0	4,9	1017,2	63,4	18,0
Julio	10,5	19,4	3,9	1018,1	50,9	69,1
Agosto	11,8	21,0	4,8	1017,9	48,2	3,6
Setiembre	17,7	27,6	10,1	1016,7	33,6	1,0
Octubre	18,0	26,4	12,1	1014,1	59,0	125,5
Noviembre	22,3	30,8	15,8	1011,3	56,0	125,2
Diciembre	23,5	32,0	16,8	1011,7	49,7	20,1
Año 2012						
Junio	11,8	22,1	4,4	1016,6	52,7	0
Julio	9,9	19,6	2,8	1019,9	43,5	0
Agosto	13,7	21,1	6,7	1017,9	54,9	30,5
Setiembre	15,7	24,9	8,8	1016,5	60,5	88,1
Octubre	17,7	25,8	11,9	1012,1	67,7	118,9
Noviembre	21,6	29,9	14,3	1011,9	57,1	73,7
Diciembre	23,0	31,8	16,1	1007,1	57,5	108,5

^a T: Temperatura media (°C). ^b TM: Temperatura máxima promedio (°C). ^c Tm: Temperatura mínima promedio (°C). ^d PA: Presión atmosférica a nivel del mar promedio (hPa). ^e H: Humedad relativa media (%). ^f PP: precipitación total de lluvia o nieve derretida en mm/m².

La figura 8.11 muestra los datos comparativos de precipitaciones (en mm/m²) y la acumulación de grados-día (GDD) por mes de desarrollo de los cultivos. Los GDD entre siembra y cosecha fueron 1831,5; 2038,3 y 1965,5 para las plantas cultivadas en 2010, 2011 y 2012 respectivamente, calculados según la Ecuación 5.1.

La tabla 8.6 muestra el rendimiento (en kg.ha⁻¹) y la composición de CVV de los lotes de coriandro según el año de producción, y la figura 8.12 es un gráfico de puntos del área total de los cromatogramas obtenidos por HS-SPME de las semillas por año de producción.

⁵ Fuente: <https://www.tutiempo.net/clima/ws-873440.html>



Año 2010

Año 2011

Año 2012

Figura 8.11. Datos de precipitaciones y grados de crecimiento diario acumulado mensual de los años de producción de coriandro 2010, 2011 y 2012 en Cañada de Luque, Córdoba, Argentina.

Tabla 8.6. Rendimiento y composición de volátiles de semillas de *C. sativum* producido en Cañada de Luque, Córdoba, Argentina, años 2010, 2011 y 2012. Se muestran valores promedios de tres determinaciones, cuyos CV fueron menores al 5 %.

Compuesto	% ^{1,2}		
	Año 2010	Año 2011	Año 2012
α -pineno	5,1 ^b	0,6 ^a	5,0 ^b
canfeno	0,5 ^b	ND ^a	0,4 ^b
β -pineno	0,8 ^b	ND ^a	0,8 ^b
mirreno	2,1 ^c	0,5 ^a	1,4 ^b
<i>p</i> -cimeno	1,6 ^b	0,6 ^a	1,6 ^b
limoneno	3,8 ^c	0,7 ^a	1,7 ^b
<i>cis</i> -ocimeno	0,4 ^b	ND ^a	0,1 ^a
<i>trans</i> - β -ocimeno	0,5 ^b	ND ^a	0,2 ^a
γ -terpineno	11,9 ^c	5,8 ^a	8,0 ^b
α -terpinoleno	0,8 ^b	0,3 ^a	0,4 ^a
linalool	59,9 ^a	80,9 ^c	74,3 ^b
alcanfor	4,7 ^b	2,9 ^a	2,7 ^a
citronelal	0,5	0,3	0,2
4-terpineol	0,2	0,2	0,2
α -terpineol	0,3	0,3	0,3
<i>cis</i> -geraniol	1,1 ^a	1,7 ^b	1,1 ^a
<i>trans</i> -geraniol (nerol)	0,1	ND	ND
linalil propionato	0,2 ^a	1,6 ^b	ND ^a
geranil acetato	1,4 ^a	3,5 ^b	1,6 ^a
tetradecano	4,1 ^b	ND ^a	ND ^a
Relación γ -terpineno/ <i>p</i> -cimeno	7,4	9,5	5,0
Rendimiento (kg/ha)	2450	1500	2000

¹ Cuantificado por GC-FID; ² Letras distintas indican diferencias significativas cuando se realiza un ANOVA con test Tukey ($p < 0,05$). ND: Compuesto no detectado.

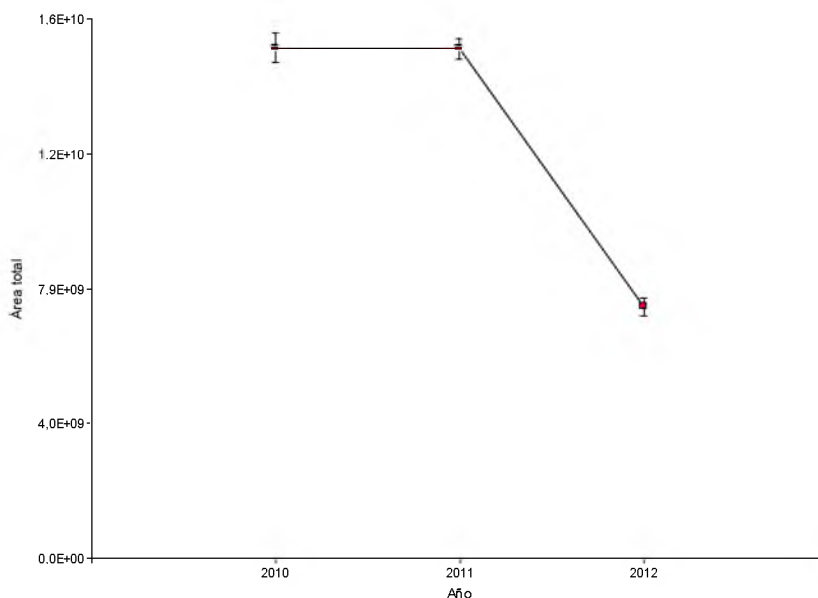


Figura 8.12. Áreas totales de los cromatogramas de semillas de *C. sativum* medidas por HS-SPME según año de producción.

El año 2010 fue el de mayor rendimiento por hectárea, mientras que la producción de 2011 resultó la menor. Los rendimientos obtenidos fueron altos en comparación a los datos disponibles de otros países (Ayanoglu *et al.*, 2002; Zheljazkov *et al.*, 2008; Moniruzzaman *et al.*, 2015), aunque comparable con resultados anteriores obtenidos en la Provincia de Buenos Aires, Argentina (Paunero *et al.*, 2014). La cantidad de volátiles totales en las campañas 2010 y 2011 son muy similares, mientras que en la del 2012 es notablemente menor (Figura 8.12). Con respecto a los CVV hallados en cada producto, las diferencias y similitudes más importantes se resumen a continuación:

- (a) En las semillas producidas en 2010 se halló un mayor número de CVV totales, (20 volátiles) en comparación con los encontrados en 2011 (14 CVV) y en 2012 (17 CVV).
- (b) El componente principal en los tres casos fue el linalool, que osciló entre el 59,9 % (cosecha 2010) y el 80,9 % (cosecha 2011), lo cual es concordante con las cantidades reportadas, que van desde 55 % (Pino *et al.*, 1996), 63 % (Anitescu *et al.*, 1997), 65-82 % (Zheljazkov *et al.*, 2008), 70-75 % (Jeliazkova *et al.*, 1997), 72-83 % (Gil *et al.*, 2002) y 79,7-86,9 % (Paunero *et al.*, 2014).
- (c) Los CVV encontrados en las semillas cultivadas en 2010 que no se detectaron en las de 2011 fueron canfeno, β -pineno, *cis*-ocimeno, *trans*- β -ocimeno, *trans*-geraniol y tetradecano.
- (d) Los CVV hallados en las semillas cultivadas en 2010 que no fueron encontrados en las de 2012 fueron *trans*-geraniol, linalil propionato y tetradecano.
- (e) Se encontraron diferencias en las concentraciones de α -pineno; limoneno; γ -terpineno; alcanfor; linalil propionato; geranil acetato y tetradecano en los diferentes lotes estudiados.
- (f) La relación γ -terpineno/*p*-cimeno resultó típica de las muestras frescas en todos los lotes estudiados, lo cual demuestra que los materiales vegetales no sufrieron degradación (Bandoni *et al.*, 1998; Paunero *et al.*, 2014).

Los cambios en el rendimiento y la composición de volátiles producidos por diferentes años de cultivo han sido reportados previamente (Zheljazkov *et al.*, 2008), habiéndose encontrado que el genotipo y el año de cultivo tienen un efecto significativo en el rendimiento y la composición del aceite esencial de coriandro (Gil *et al.*, 2002; Zheljazkov *et al.*, 2008; Paunero *et al.*, 2014). Los resultados hallados en este estudio confirman los informes anteriores sobre el efecto del año de cultivo en el rendimiento de la producción y en la composición de CVV de cilantro. Sin embargo, no se encontraron estudios que

correlacionaran las variables meteorológicas con la cantidad de volátiles producida y la composición de CVV. Por esa razón, realizamos un estudio de correlación de Pearson entre los datos meteorológicos de los años de cultivo, los valores de GDD y los resultados obtenidos de cantidad de volátiles totales (representada por las áreas totales de los cromatogramas) y la composición de CVV. La tabla 8.7 muestra sólo aquellos resultados (variable 1) que correlacionaron significativamente ($p < 0,05$) con los factores meteorológicos (variable 2).

Tabla 8.7. Correlación de Pearson ($\alpha=0,05$) entre los resultados obtenidos y los factores meteorológicos de los años de cultivo de *C. sativum*.

Variable 1 ^a	Variable 2 ^b	r/p ^c
limoneno	GDD acumulada	-0,97/0,02
<i>trans</i> - β -ocimeno		-0,98/0,03
γ -terpineno		-0,99/0,006
linalool		0,99/0,02
α -terpinoleno	Temperatura media	-0,98/0,02
<i>trans</i> -geraniol		-0,96/<0,0001
tetradecano		-0,92/<0,0001
<i>cis</i> -ocimeno	Temperatura máxima media	-0,91/<0,0001
α -terpinoleno		-0,98/0,03
linalool		0,99/0,04
mirceno	Temperatura mínima media	-0,91/0,04
<i>trans</i> - β -ocimeno		-0,97/<0,0001
γ -terpineno		-0,91/0,02
Volátiles totales	Humedad relativa media	-0,97/0,004
4-terpineol		-0,96/0,04
<i>cis</i> -geraniol		0,99/0,04
Volátiles totales	Precipitación total de lluvia caída	-0,98/0,02

^a Variables correspondientes a los resultados obtenidos de rendimiento de la producción de coriandro, y su contenido y composición de volátiles. ^b Variables correspondientes a factores climáticos y GDD. ^c La correlación fue expresada como r (coeficiente de correlación de Pearson)/p, considerándose significativa cuando $p < 0,05$.

Como se puede observar en la tabla 8.7, la temperatura fue el factor ambiental que más influencia ejerció sobre la cantidad y composición de CVV de las semillas de coriandro, especialmente los grados por día acumulados durante el desarrollo de las plantas (GDD). Estos resultados son coherentes con reportes anteriores sobre cómo la temperatura determina el ritmo de crecimiento, modificando también el ritmo biológico de cada especie y la velocidad de desarrollo, lo cual afecta, por ejemplo, el rendimiento de la producción (Maldonado *et al.*, 2006; Zheljaskov *et al.*, 2008; Moniruzzaman *et al.*, 2015).

La mayoría de las variables correlacionan negativamente con los factores ambientales en estudio. En este sentido, limoneno correlaciona negativamente con los grados por día

acumulados; *trans*- β -ocimeno y γ -terpineno, con los grados por día acumulados y con el promedio de la temperatura mínima del período de desarrollo de las plantas; α -terpinoleno, con la media de la temperatura y con el promedio de la temperatura máxima; *trans*-geraniol y tetradecano, con la temperatura media; *cis*-ocimeno, con el promedio de temperatura máxima; mirceno, con la media de la temperatura mínima; y 4-terpineol, con la humedad relativa porcentual promedio. La cantidad total de volátiles, representada por las áreas totales de los cromatogramas, correlaciona negativamente con la humedad relativa porcentual promedio y la cantidad de lluvia caída durante el desarrollo de las plantas de coriandro.

Con respecto a las variables que correlacionan positivamente con los factores ambientales, son sólo linalool, que correlaciona positivamente con los grados por día acumulados y con temperatura máxima promedio, y *cis*-geraniol, que correlaciona positivamente con la humedad relativa porcentual promedio.

Otros investigadores han reportado bajo contenido en aceites esenciales y ácidos grasos en cosechas con frutos grandes, las cuales se originan en zonas con clima subtropical (más húmedos). En esos casos, la umbel primaria termina la floración más rápidamente, afectando el contenido de volátiles de los frutos (Smallfield *et al.*, 1994; Diederichsen, 1996; Tomitaka *et al.*, 2001; Moosavi, 2012). Eso es concordante con los resultados encontrados en este trabajo, donde la cantidad de volátiles totales y la mayoría de los CVV correlacionaron negativamente con la humedad y la cantidad total de lluvia caída.

Es interesante destacar que este estudio posibilitó demostrar que coriandro se puede cultivar con éxito en el noreste de la Provincia de Córdoba. Los rendimientos de biomasa y la composición de CVV fueron similares a los informes de la literatura disponibles en el mercado de otros países productores no sólo de coriandro, sino también de aceite esencial (Ayanoglu *et al.*, 2002; Zheljazkov *et al.*, 2008; Moniruzzaman *et al.*, 2015), siendo estos resultados coincidentes con reportes para la Provincia de Buenos Aires (Paunero *et al.*, 2014).

Capítulo 9

Caracterización de compuestos volátiles en especies del género *Clinopodium* (Lamiaceae). Estudio comparativo entre *C. odorum* silvestre y plantas cultivadas *in vitro*.

-
- 9.1- Introducción.
 - 9.2- Optimización del muestreo por HS-SPME.
 - 9.2.1- Selección del tipo de fibra SPME.
 - 9.2.2- Selección de la temperatura de trabajo.
 - 9.2.3- Selección del tiempo de equilibrado del HS.
 - 9.2.4- Selección del tiempo de exposición de la fibra en el HS.
 - 9.3- Caracterización de compuestos volátiles en *Clinopodium odorum*.
 - 9.3.1- Comparación entre el análisis por HS-SPME y del aceite esencial.
 - 9.3.2- Diferencias entre la composición de inflorescencias, tallos y hojas.
 - 9.4- Caracterización de compuestos volátiles en *Clinopodium gilliesii*.
 - 9.4.1- Comparación entre el análisis por HS-SPME y del aceite esencial.
 - 9.4.2- Diferencias entre la composición de inflorescencias, tallos y hojas.
 - 9.5- Comparación de la composición de volátiles en las dos especies de *Clinopodium*.
 - 9.6- Aplicación de la metodología de HS-SPME desarrollada para la comparación de la composición de volátiles de *C. odorum* silvestre y plantas micropropagadas *in vitro* de la misma especie.
-

9.1- Introducción

Lamiaceae es una familia muy diversa que incluye alrededor de 240 géneros y unas 7200 especies, divididas en 7 subfamilias (Harley *et al.*, 2004; Harley & Pastore, 2012). Pertenece al orden Lamiales y está relacionada con Verbenaceae, Acanthaceae, Scrophulariaceae, Gesneriaceae, Lentibulariaceae, Buddlejaceae y Bignoniaceae, sin que las relaciones entre ellas se hayan resuelto totalmente (Martínez-Gordillo *et al.*, 2013). Aun cuando esta familia tiene su centro de diversidad en Europa, principalmente en el área del Mediterráneo, su presencia en América es importante, ya que muchas especies introducidas se han naturalizado (Velázquez, 1997). Esta familia tiene importancia económica en varias partes del mundo, ya que muchas de sus especies se usan como condimentos (*Origanum*, *Thymus*, *Mentha*), para obtener aceites esenciales (*Lavandula*, *Pogostemon*, *Salvia*) y/o como ornamentales (*Coleus*, *Salvia*, *Scutellaria*) (Martínez-Gordillo *et al.*, 2013). Dentro de esta familia, *Clinopodium* L. (Subfam. Nepetoideae, Tribe Mentheae, Subtribu Menthinae) incluye alrededor de 100 especies de hierbas aromáticas perennes, raramente anuales y arbustos, principalmente en América, Europa, África, Asia tropical e Indomalasia (Harley & Paucar, 2000).

Clinopodium odorum (Griseb.) Harley [sinonimia: *Satureja odora* (Griseb.) Epling] (Figura 9.1), es un arbusto de hasta 2 metros de altura, nativo de Bolivia y Argentina, que tiene un aroma agradable y crece salvaje en la cordillera de la Argentina central (Barboza *et al.*, 2006). Se encuentra en sitios no perturbados de laderas montañosas, entre 1500 y 2000 metros sobre el nivel del mar (Barboza *et al.*, 2006). En Argentina también se la conoce como *muña-muña*, *salviolora*, *peperina* o *piperina* (Barboza *et al.*, 2006). Se han hallado evidencias sobre la actividad biológica del AE de *C. odorum* contra bacterias (Fuselli *et al.*, 2008; Gende *et al.*, 2014; Pellegrini *et al.*, 2014; Tepe & Cilkiz, 2016), hongos (Boulogne *et al.*, 2012) e insectos (Boulogne *et al.*, 2012). También se ha demostrado que tiene actividad antioxidante (Desmarchelier *et al.*, 1997) y citotóxica en modelos tumorales (Mongelli *et al.*, 1996).

C. odorum se utiliza como agente aromatizante en los alimentos (Barboza *et al.*, 2009) y en medicina tradicional como anticatarral, antiespasmódico, carminativo, diurético, astringente, laxante, estimulante, soporífero, vermífugo, supresor menstrual, afrodisíaco (Harley & Paucar, 2000; Mahady, 2005; Barboza *et al.*, 2009), digestivo y antiácido (Barboza *et al.*, 2006; Goleniowski *et al.*, 2006; Teves *et al.*, 2015). También es usado para combatir el apunamiento (Orfila *et al.*, 1996; Harley & Paucar, 2000) y como ayuda en el momento del parto (Harley & Paucar, 2000).



Figura 9.1. *Clinopodium odorum* (Elechosa *et al.* 2009).

Por otra parte, *Clinopodium gilliesii* (Benth.) Kuntze [Lamiaceae, sinonimia: *Satureja parvifolia* (Philippi) Epling] (Figura 9.2), es una planta aromática que crece en Perú, Chile, Bolivia y al borde de los ríos que descienden de las colinas en las provincias noroccidentales de la Argentina. (Salta, Jujuy, Córdoba, Catamarca, Tucumán, La Rioja, San Juan y San Luis) (Orfila *et al.*, 1996). En Argentina se la conoce con el nombre común de *salvilori*, *muña-muña*

(Barbosa *et al.*, 2006) y *mulla-mulla* (Orfila *et al.*, 1996). Se han reportado evidencias de su actividad biológica contra bacterias (Feresin *et al.*, 2001; Luna *et al.*, 2008; Lima *et al.*, 2011; Tepe & Cilkiz, 2016), hongos (Viturro *et al.*, 2007; Boulogne *et al.*, 2012), insectos (Toloza *et al.*, 2010; Lima *et al.*, 2011; Boulogne *et al.*, 2012) y parásitos (Debenedetti *et al.*, 2002; Sülsen *et al.*, 2006; van Baren *et al.*, 2006). También se ha demostrado que tiene actividad antioxidante (Desmarchelier *et al.*, 1997; Dade *et al.*, 2009; Cabana *et al.*, 2013), citotóxica en modelos tumorales (Mongelli *et al.*, 1996), afrodisíaca (Hnatyszyn *et al.*, 2003), alelopática (Mongelli *et al.*, 1997) y es inhibidor de la actividad de las enzimas acetilcolinesterasa y butirilcolinesterasa (Cabana *et al.*, 2013).

La hierba fresca o seca se utiliza como aromatizante en alimentos (Viturro *et al.*, 2007), y en medicina tradicional, es usada como afrodisíaco, digestivo, estimulante, emenagogo y febrífugo (Sülsen *et al.*, 2006). También es empleada para combatir el apunamiento, los resfriados y la esterilidad femenina (Barbosa *et al.*, 2006; Viturro *et al.*, 2007).



Figura 9.2. *Clinopodium gilliesii* (Elechosa *et al.* 2009).

Tanto *C. odorum* como *C. gilliesii* soportan un alto nivel de extracción como resultado de su uso en medicina popular (Martínez *et al.*, 2005; Goleniowski *et al.*, 2006; Martínez, 2015) y como saborizante de yerba mate (infusión tradicional argentina) (Goleniowski *et al.*, 2006). Sin embargo, este alto nivel de extracción es más importante en el caso de *C. odorum* por su utilización en la preparación de bebidas denominados *amargos serranos* (Elechosa *et al.*, 2009; Díaz *et al.*, 2012). A ello debe sumarse el hecho de que la Provincia de Córdoba posee una tasa de deforestación anual de aproximadamente un 3 % (Arias Toledo *et al.*, 2010), lo que hace necesario realizar importantes esfuerzos para evitar la extinción de estas especies nativas y mantener la biodiversidad (Elechosa *et al.*, 2009; Giorgis *et al.*, 2011). Entre las

herramientas de conservación se usan las técnicas de propagación *in vitro* para el establecimiento de bancos de germoplasma de las especies nativas (Sánchez-Chiang & Jiménez, 2010). El uso de técnicas *in vitro* para la propagación rápida y en masa ofrece posibilidades de recuperación de especies amenazadas, reduciendo así el riesgo de extinción (Rubluo *et al.*, 1993). El establecimiento de bancos de germoplasma *in vitro* tiene gran importancia en los países en vías de desarrollo, aunque deben estar asociadas con otras prácticas de conservación de recursos fitogenéticos (Alves & Guerra, 2001; Pradhan & Badola, 2010; Diaz *et al.*, 2012), tales como la recolección sustentable de la flora autóctona, esto es, la no de depredación, sino de favorecimiento de su desarrollo (Elechosa *et al.*, 2009). Adicionalmente, las técnicas de conservación *in vitro* permiten el intercambio de materiales entre bancos de germoplasma, los cuales mantienen sus condiciones sanitarias y viabilidad durante el transporte, razón por la cual estas técnicas podrían permitir la producción de un gran número de plantas clonales en períodos relativamente cortos, usando muy poco material de partida (Diaz *et al.*, 2012).

En este capítulo se describe la optimización de una técnica de HS-SPME para la caracterización de CVV en *C. odorum* y *C. gilliesii*, y para estudios comparativos entre ambas especies y entre *C. odorum* silvestre y plantas propagadas *in vitro*.

9.2- Optimización del muestreo por HS-SPME

9.2.1- Selección del tipo de fibra SPME

La figura 9.3 muestra el efecto del tipo de fibra sobre el área total de picos y sobre el área de los picos de algunos CVV. El orden de eficiencia de extracción de volátiles determinado a partir del área total fue: DVB-CAR-PDMS \geq PDMS-DVB > PDMS > CAR-PDMS \geq PA, siendo la fibra DVB-CAR-PDMS la que mostró una extracción entre un 50-70% mayor que el resto de las fibras estudiadas. Cuando se realizó el análisis de varianza (ANOVA) con test de Tukey para las áreas totales (Tabla 9.1), hubo diferencias significativas entre todas las fibras excepto PA y CAR-PDMS, cuyas diferencias no fueron significativas ($p < 0,05$).

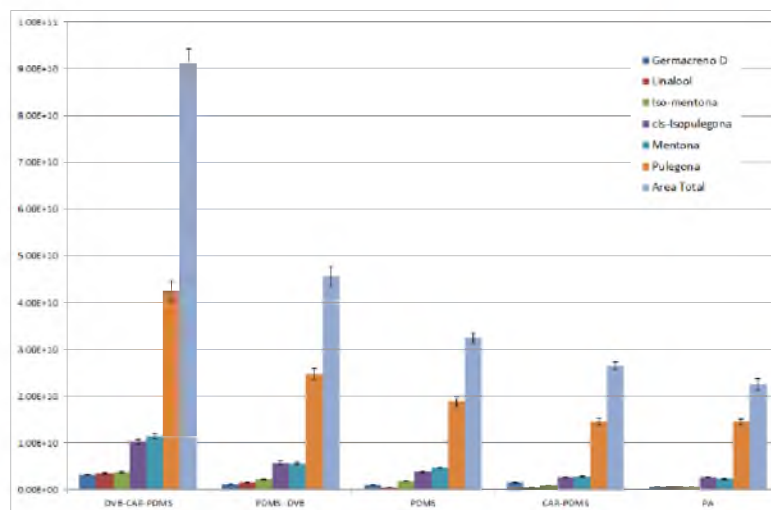


Figura 9.3. Efecto del tipo de fibra sobre el proceso de microextracción de componentes volátiles de *C. odorum*.

Todos los CVV de *C. odorum* fueron mejor extraídos con la fibra DVB-CAR-PDMS, aunque es más notable en el caso de pulegona, mentona y *cis*-isopulegona (Figura 9.3). Estos resultados se debieron probablemente al recubrimiento de la fibra con carboxeno (carbón activado), el cual es adecuado para la adsorción de moléculas volátiles de bajo peso molecular y polaridad media a baja; DVB, que adsorbe solutos más pesados y de polaridad intermedia; y PDMS, que absorbe solutos de baja polaridad de un amplio rango de pesos moleculares (volátiles y semivolátiles) (Pawliszyn 2012). Además, esta fibra contiene una combinación de materiales sorbentes líquidos (PDMS) y sólidos (DVB y CAR) en comparación con las otras fibras evaluadas, lo que conduce a una sorción equilibrada de compuestos volátiles y semivolátiles (Bianchin *et al.*, 2012). Esto también se ha demostrado en una amplia gama de analitos volátiles y semivolátiles a partir de muestras diferentes (Rey-Salgueiro *et al.*, 2009; Bogusz *et al.*, 2011; Bianchin *et al.*, 2012; Merkle *et al.*, 2015; Corpas *et al.*, 2016).

Por todo lo anterior, se seleccionó la fibra DVB-CAR-PDMS para los análisis sucesivos.

9.2.2- Selección de la temperatura de trabajo

La figura 9.4 muestra el efecto de la temperatura de microextracción sobre el área total de picos y sobre el área de algunos CVV de *C. odorum*. El aumento de temperatura incrementa ligeramente el área total de picos hasta los 40 °C, temperatura a partir de la cual empiezan a disminuir notablemente. Sin embargo, la temperatura de extracción afecta de manera diferente a cada CVV de *C. odorum*: en el caso de las áreas de los picos de pulegona, *cis*-isopulegona y

germacreno D, el patrón es el mismo que en el caso del área total, mientras que para mentona, *iso*-mentona y linalool, sus áreas siempre decrecen con el aumento de temperatura. Cuando se realizó un ANOVA sobre las áreas totales a las distintas temperaturas, no se observaron diferencias significativas entre las temperaturas 30 y 40 °C, pero si entre ellas y las demás temperaturas estudiadas (Tabla 9.1). Estas diferencias pueden estar relacionadas con el efecto de la temperatura sobre sus coeficientes de distribución entre el HS y la fibra, que, como se vio en el Capítulo 3, hay casos en los que aumentan y otros en los que disminuyen con la temperatura, dependiendo de sus puntos de ebullición (Wercinski, 1999; Pawliszyn, 2012). En este estudio se observó que, a partir de los 40 °C, disminuye la cantidad de todos los CVV, lo que implicaría que la desorción de componentes desde la fibra se hace más importante que la ab/adsorción (Wercinski, 1999; Pawliszyn, 2012). Resultados similares se obtuvieron en la optimización de la técnica HS-SPME para la determinación de CVV de diversos tipos de muestras (Hamm *et al.*, 2003; Ma *et al.*, 2013; Vandendriessche *et al.*, 2013; Bianchin *et al.* 2014).

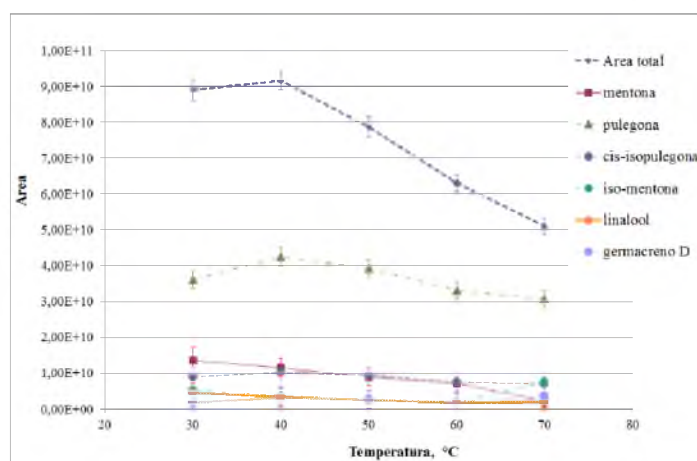


Figura 9.4. Efecto de la temperatura sobre el proceso de microextracción de componentes volátiles de *C. odorum*.

A partir de los resultados, y debido a que no hubo diferencias significativas en el área total entre 30 y 40 °C (Tabla 9.1), se seleccionó la temperatura de 40 °C como temperatura de trabajo.

9.2.3- Selección del tiempo de equilibrado del HS

La figura 9.5 muestra el efecto del tiempo de equilibrado del HS sobre el área total de picos de los cromatogramas y sobre el área de algunos CVV de *C. odorum*. El incremento en el

tiempo de equilibrio del HS no afecta significativamente al proceso de SPME. Cuando se realizó un ANOVA (Tabla 9.1), no hubo diferencias significativas en los diferentes tiempos estudiados, razón por la cual se optó por equilibrar el HS durante 10 minutos. Resultados similares se obtuvieron en otros estudios de optimización, con tiempos óptimos de 10 min de equilibrado del HS o incluso menores (Ma *et al.*, 2013; Vandendriessche *et al.*, 2013).

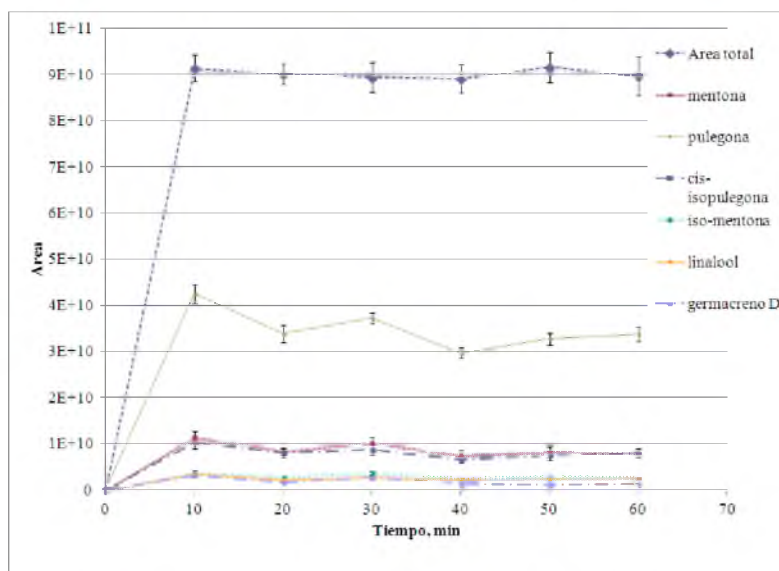


Figura 9.5. Efecto del tiempo de equilibrado del HS sobre el proceso de microextracción de componentes volátiles de *C. odorum*.

9.2.4- Selección del tiempo de exposición de la fibra en el HS

La figura 9.6 muestra el efecto del tiempo de exposición de la fibra en el HS sobre el proceso de microextracción. Al igual que en el caso del estudio del efecto del tiempo de equilibrado del HS, el incremento en el tiempo de exposición de la fibra en el HS no afectó significativamente al área total de picos de cromatograma ni a los CVV de *C. odorum*. Cuando se realizó un ANOVA, no hubo diferencias significativas en las áreas en los diferentes tiempos estudiados, razón por la cual se optó por un tiempo de exposición de fibra de 10 minutos (Tabla 9.1).

En la tabla 9.1 se muestran los valores de las áreas totales obtenidas con sus respectivas desviaciones estándares y los resultados del test Tukey ($p < 0,05$) del ANOVA en la optimización de las condiciones experimentales para el análisis de especies del género *Clinopodium*.

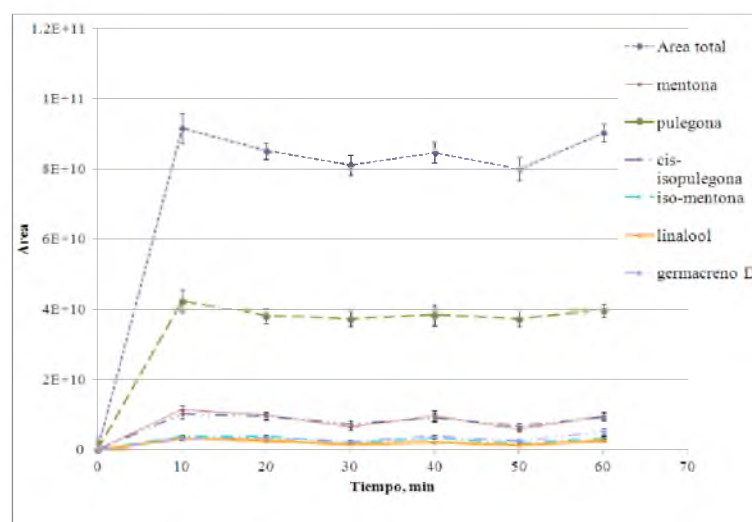


Figura 9.6. Efecto del tiempo de exposición de la fibra en el HS sobre el proceso de microextracción de componentes volátiles de *C. odorum*.

Tabla 9.1. Optimización de las condiciones experimentales para el análisis de especies del género *Clinopodium spp.*

Variable	Categoría	Área total	SD ¹	Test Tukey ²
Tipo de fibra	PA	2,24E+10	3,2E+09	A
	CAR-PDMS	2,65E+10	2,1E+09	A
	PDMS	3,25E+10	1,0E+09	B
	PDMS-DVB	4,56E+10	7,5E+08	C
	DVB-CAR-PDMS	9,12E+10	1,2E+09	D
Temperatura (°C)	30	8,89E+10	2,9E+09	D
	40	9,16E+10	2,6E+09	D
	50	7,86E+10	2,8E+09	C
	60	6,30E+10	2,2E+09	B
	70	5,10E+10	2,3E+09	A
Tiempo de equilibrado del HS (min)	10	9,14E+10	2,9E+09	A
	20	9,01E+10	2,3E+09	A
	30	8,94E+10	3,2E+09	A
	40	8,91E+10	3,1E+09	A
	50	9,16E+10	3,2E+09	A
	60	8,97E+10	4,2E+09	A
Tiempo de exposición de la fibra (min)	10	9,17E+10	4,3E+09	A
	20	8,52E+10	2,3E+09	A
	30	8,11E+10	2,9E+09	A
	40	8,47E+10	3,0E+09	A
	50	8,00E+10	3,4E+09	A
	60	9,04E+10	2,4E+09	A

¹ Desviación estándar de determinaciones por triplicado.

² Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

A partir de los resultados de optimización, las condiciones adoptadas para el análisis de especies de *Clinopodium* fueron: fibra extractante: DVB-CAR-PDMS; temperatura de extracción: 40 °C; 10 minutos de equilibrio del HS y 10 minutos de exposición de la fibra en el HS.

9.3- Caracterización de compuestos volátiles en *Clinopodium odorum*

Se caracterizaron los CVV de muestras de planta entera de *C. odorum* por las técnicas de hidrodestilación y HS-SPME. Los resultados se utilizaron para compararlos entre sí y, adicionalmente, con los obtenidos a partir de la caracterización de CVV en *C. gilliesii* y en plantas de *C. odorum* propagadas *in vitro*. Por otro lado, también se analizaron por HS-SPME las partes aéreas por separado (hojas, inflorescencias y tallos), con la finalidad de determinar similitudes y diferencias en la producción de CVV. Los resultados se resumen en la tabla 9.2, y las estructuras químicas de algunos CVV se muestran en la figura 9.7.

Tabla 9.2. Componentes volátiles hallados en *C. odorum* por análisis del aceite esencial y HS-SPME, usando una fibra DVB-CAR-PDMS 50/30 μm ; temperatura de extracción de 40 $^{\circ}\text{C}$; 10 minutos de equilibrio del HS y 10 minutos de exposición de la fibra en el HS. Se muestran valores promedios de tres determinaciones, cuyos CV fueron menores al 5 %.

Pico	t_R^a (min)	Compuesto ^b	KI ^c (Ex)	KI ^d (Lit)	H. ^f	T. ^g	% ^e F. ^h	P.E. ⁱ	A.E. ^j
1	16,40	α -pineno	952	952	0,07 ^b	ND ^a	1,4 ^c	0,1 ^b	1,2 ^c
2	17,20	β -pineno	964	969	0,1 ^b	ND ^a	0,7 ^c	0,3 ^b	0,8 ^c
3	17,84	β -mirceno	985	983	0,1 ^b	ND ^a	0,3 ^b	0,3 ^b	0,5 ^b
4	19,38	sabineno	1007	1001	0,8 ^c	ND ^a	0,2 ^b	0,3 ^b	ND ^a
5	20,17	δ -3-careno	1017	1016	0,2 ^b	ND ^a	ND ^a	0,3 ^b	ND ^a
6	20,38	limoneno	1020	1033	2,7 ^b	16,4 ^d	4,0 ^c	1,2 ^a	2,7 ^b
7	20,57	eucaliptol	1022	1023	ND ^a	ND ^a	10,0 ^c	ND ^a	2,4 ^b
8	22,05	<i>trans</i> - β -ocimeno	1042	1044	0,3 ^b	ND ^a	0,7 ^b	0,5 ^b	0,6 ^b
9	22,64	γ -terpineno	1050	1050	0,2 ^b	ND ^a	ND ^a	ND ^a	0,2 ^b
10	26,02	linalool*	1095	1092	1,4 ^b	ND ^a	2,0 ^c	1,4 ^b	1,9 ^c
11	27,08	1-octenil-3-acetato	1111	1111	4,9 ^c	ND ^a	ND ^a	0,2 ^b	0,5 ^b
12	28,42	óxido de <i>cis</i> -limoneno	1132	1140	9,9 ^c	ND ^a	ND ^a	0,05 ^b	0,1 ^b
13	29,70	isomentona	1153	1153	0,5 ^b	1,8 ^c	0,4 ^b	2,2 ^c	0,2 ^b
14	30,56	mentona	1166	1166	2,8 ^a	8,0 ^c	2,8 ^a	9,2 ^d	4,2 ^b
15	31,21	<i>cis</i> -isopulegona	1177	1173	3,7 ^b	4,2 ^b	1,6 ^a	12,1 ^c	1,9 ^a
16	31,96	<i>trans</i> -isopulegona	1188	1188	0,3 ^b	ND ^a	1,6 ^c	0,2 ^b	0,2 ^b
17	32,36	α -terpineol	1195	1196	0,2 ^a	1,7 ^b	3,2 ^c	0,4 ^a	1,7 ^b
18	32,39	dodecano	1201	1200	ND ^a	ND ^a	0,9 ^b	ND ^a	0,5 ^b
19	32,61	<i>cis</i> - α -terpineol	1204	1209	ND ^a	ND ^a	1,2 ^b	ND ^a	ND ^a
20	33,12	β -fenchil acetato	1223	1222	ND ^a	ND ^a	2,2 ^b	ND ^a	ND ^a

Tabla 9.2. Continuación.

Pico	t _R ^a (min)	Compuesto ^b	KI ^c (Ex)	KI ^d (Lit)	H. ^f	T. ^g	% ^e F. ^h	P.E. ⁱ	A.E. ^j
21	33,49	α -fenchil acetato	1225	1226	ND ^a	ND ^a	0,7 ^b	ND ^a	0,4 ^b
22	34,23	pulegona*	1249	1249	35,5 ^b	35,1 ^b	16,1 ^a	51,8 ^d	41,0 ^c
23	34,51	óxido de piperitona	1258	1259	5,8 ^c	2,0 ^b	7,2 ^d	1,3 ^a	13,9 ^e
24	34,72	óxido de carvona	1264	1263	11,4 ^d	ND ^a	6,2 ^c	ND ^a	0,3 ^b
25	34,83	diosfenol	1268	1273	0,3 ^b	ND ^a	1,4 ^c	0,4 ^b	0,1 ^b
26	34,95	isobornil acetato	1272	1275	0,3	ND ^a	0,9	ND ^a	0,3
27	35,31	<i>trans</i> -anetol	1283	1283	2,3	ND ^a	ND	0,2	0,4
28	35,40	<i>trans</i> -sabinil acetato	1286	1284	1,0 ^b	2,4 ^c	4,1 ^d	0,1 ^a	0,4 ^a
29	35,52	<i>cis</i> -sabinil acetato	1290	1291	0,2 ^b	ND ^a	1,3 ^c	0,2 ^b	0,2 ^b
30	35,72	timol	1296	1295	0,3 ^b	ND ^a	0,6 ^b	0,3 ^b	0,7 ^b
31	35,82	carvacrol*	1299	1299	0,5 ^b	ND ^a	0,4 ^b	ND ^a	0,2 ^b
32	36,16	N.I. **	1312	-	ND	ND ^a	0,4	0,08	ND
33	36,51	δ -elemeno	1325	1325	ND ^a	ND ^a	ND ^a	0,2 ^b	ND ^a
34	36,59	α -metilcinnamaldehído	1328	1330	0,2 ^b	ND ^a	0,5 ^c	0,2 ^b	ND ^a
35	36,72	bicicloelemeno	1333	1334	0,6 ^b	5,1 ^d	0,6 ^b	1,0 ^c	0,1 ^a
36	36,88	piperitenona	1339	1339	0,5 ^b	ND ^a	1,5 ^c	0,2 ^b	0,4 ^b
37	37,13	α -cubebeno	1348	1345	0,3 ^b	ND ^a	ND ^a	0,3 ^b	ND ^a
38	37,78	óxido de piperitenona	1373	1369	2,4 ^b	2,1 ^b	12,0 ^c	0,1 ^a	15,7 ^d
39	37,85	α -ylangeno	1375	1377	0,2 ^b	ND ^a	ND ^a	0,3 ^b	ND ^a
40	38,07	β -bourboneno	1384	1385	0,2 ^a	1,7 ^b	1,3 ^b	0,3 ^a	0,4 ^a
41	38,23	β -elemeno	1390	1391	0,3	ND ^a	0,5 ^b	0,5 ^b	0,3 ^b
42	38,49	α -copaeno	1400	1400	0,1 ^b	ND ^a	0,4 ^c	0,2 ^b	0,6 ^b
43	38,59	N.I. **	1403	-	0,1 ^b	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a
44	38,76	isolongifoleno	1411	1406	0,3 ^b	ND ^a	1,0 ^c	0,1 ^b	ND ^a
45	38,96	β -cariofileno	1419	1418	0,1 ^b	ND ^a	0,9 ^c	0,6 ^{b,c}	0,4 ^b
46	39,19	β -cubebeno	1429	1432	0,1 ^b	ND ^a	0,5 ^c	0,5 ^c	0,1 ^b
47	39,41	γ -elemeno	1438	1433	0,4 ^b	ND ^a	0,2 ^b	0,2 ^b	ND ^a
48	39,63	aromadendreno	1447	1446	0,4 ^b	ND ^a	0,4 ^b	0,5 ^b	0,3 ^b
49	39,65	α -gurjuneno	1448	1449	0,2 ^b	ND ^a	0,4 ^b	0,5 ^b	ND ^a
50	39,81	calareno	1455	1458	0,4 ^b	ND ^a	0,4 ^b	0,3 ^b	ND ^a
51	39,93	α -elemeno	1460	1460	0,1 ^b	ND ^a	ND ^a	0,2 ^b	ND ^a
52	40,03	germacreno B	1463	1463	0,1 ^b	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a
53	40,12	γ -muuroleno	1468	1469	0,1 ^b	ND ^a	0,6 ^c	0,7 ^c	ND ^a
54	40,26	<i>epi</i> -biciclosesquifelandreno	1474	1471	0,4 ^b	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a
55	40,36	β -selineno	1478	1479	0,2 ^b	ND ^a	0,5 ^c	0,1 ^b	0,1 ^b
56	40,45	α -amorfenol	1481	1481	0,4 ^b	ND ^a	ND ^a	0,6 ^b	ND ^a
57	40,52	germacreno D	1484	1485	1,3 ^b	ND ^a	1,0 ^b	2,9 ^d	1,7 ^c
58	40,88	γ -amorfenol	1489	1488	0,3 ^b	ND ^a	ND ^a	0,6 ^b	ND ^a
59	40,90	biciclogermacreno	1500	1499	1,6 ^b	2,8 ^c	0,8 ^a	2,4 ^c	0,9 ^a
60	40,97	valenceno	1503	1503	0,3 ^b	1,0 ^c	1,1 ^c	ND ^a	ND ^a
61	41,19	γ -cadineno	1512	1507	0,3 ^b	ND ^a	0,2 ^b	0,2 ^b	ND ^a
62	41,27	β -bisaboleno	1516	1514	0,4 ^b	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a
63	41,37	β -cadineno	1520	1520	0,05 ^b	ND ^a	0,6 ^c	0,8 ^c	ND ^a
64	41,49	δ -cadineno	1525	1525	0,9 ^b	1,2 ^b	1,0 ^b	1,4 ^b	0,3 ^a
65	41,72	cadina-1,4-dieno	1534	1532	0,08 ^b	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a
66	41,80	α -cadineno	1538	1538	0,2 ^b	ND ^a	0,3 ^b	0,1 ^b	ND ^a
67	41,92	α -calacoreno	1543	1546	0,1 ^b	ND ^a	ND ^a	0,3 ^b	ND ^a
68	42,56	N.I. **	1569	-	0,1	ND	ND	0,2	ND
69	42,85	spatuleno	1581	1582	0,1 ^b	11,1 ^c	0,3 ^b	0,06 ^b	0,3 ^c
70	43,01	globulol	1587	1587	ND ^a	ND ^a	0,1 ^b	0,08 ^b	0,3 ^b
71	44,15	N.I. **	1637	-	0,06	ND	ND	ND	ND
72	44,31	δ -cadinol	1644	1645	0,2 ^b	ND ^a	ND ^a	0,1 ^b	0,2 ^b
73	44,61	α -cadinol	1657	1656	0,06 ^b	2,1 ^c	0,2 ^b	ND ^a	0,2 ^b
74	45,34	N.I. **	1690	-	0,03	ND	ND	ND	0,2
75	45,48	N.I. **	1696	-	ND	ND	ND	ND	0,08

Tabla 9.2. Continuación.

Pico	t _R ^a (min)	Compuesto ^b	KI ^c (Ex)	KI ^d (Lit)	H. ^f	T. ^g	% ^e F. ^h	P.E. ⁱ	A.E. ^j
76	46,45	óxido de bisabolol A	1743	1744	ND ^a	1,5 ^c	ND ^a	ND ^a	0,1 ^b
Total					100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
% Compuestos Identificados					93,9	100,0	98,1	96,4	95,7
% Área Identificada					99,7	100,0	99,6	99,7	99,7

^a Tiempo de retención; ^b Identificado por GC-MS; ^c Índices de retención de Kovat's experimentales; ^d Índices de retención de Kovat's de literatura; ^e Cuantificados por GC-FID, letras distintas indican diferencias significativas del ANOVA con test Tukey (p<0,05); ^f Hojas; ^g Tallos; ^h Flores; ⁱ Planta entera; ^j Aceite esencial. *KI Determinados usando estándares de referencia. ** Compuesto no identificado.

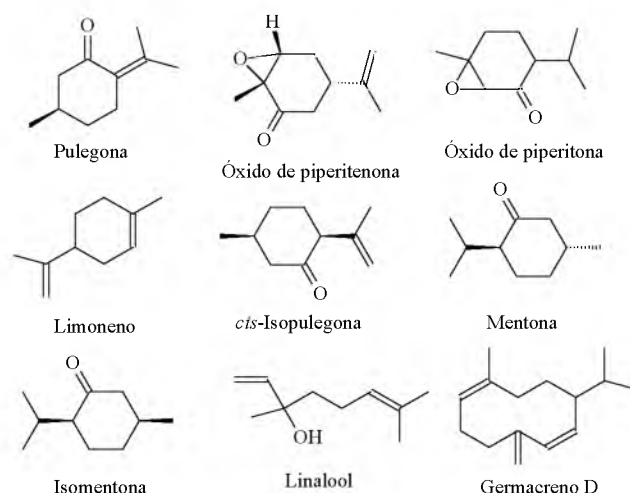


Figura 9.7. Algunos componentes volátiles hallados en *C. odorum* por análisis del aceite esencial y por muestreo mediante HS-SPME. ¹

9.3.1- Comparación entre el análisis por HS-SPME y del aceite esencial

A partir del análisis del AE de *C. odorum*, se hallaron 47 CVV diferentes, 45 de los cuales fueron identificados (95,7 %), lo que corresponde al 99,7 % del área total del cromatograma, mientras que por HS-SPME de planta entera se encontraron 56 componentes diferentes, 54 de los cuales fueron identificados (96,4 %), lo que corresponde al 99,7 % del área total del cromatograma. Esta situación representa la caracterización de un 16 % más de CVV mediante el análisis por HS-SPME (Tabla 9.2).

La composición del AE de *C. odorum* ha sido investigada por otros investigadores, los cuales coincidieron en pulegona, piperitona, isomentona, mentona, óxido de piperitona y óxido de piperitenona como componentes mayoritarios (Figura 9.7) (Zygadlo *et al.*, 1993; Muschietti *et al.*, 1996; Molina *et al.*, 2002; Viturro *et al.*, 2007), aunque se ha demostrado que las composiciones de CVV pueden resultar muy variables según su estadio de crecimiento

¹ Fuente de las estructuras químicas: Base de datos NIST: <http://webbook.nist.gov/chemistry/>

(Molina *et al.*, 2002), su quimiotipo (Viturro *et al.*, 2007) y su origen geográfico (Zygadlo *et al.*, 1993; Muschietti *et al.*, 1996; Molina *et al.*, 2002; Viturro *et al.*, 2007). En algunos quimiotipos, por ejemplo, se encontraron como componentes mayoritarios isoeugenol (Zygadlo *et al.*, 1993), cedrol (Zygadlo *et al.*, 1993) y E-isocitral (Viturro *et al.*, 2007). En este caso, tanto en el AE como en el muestreo por HS-SPME, el CVV mayoritario fue pulegona. Sin embargo, los porcentajes relativos de los otros componentes principales fueron diferentes. Mientras que el óxido piperitenona y el óxido piperitona fueron los otros componentes principales en el aceite esencial, por HS-SPME fueron *cis*-isopulegona y mentona.

Estas diferencias observadas entre los resultados obtenidos por HS-SPME de partes aéreas frescas y a partir del AE podrían explicarse por los procesos enzimáticos (Croteau *et al.*, 1991) y los cambios microbiológicos (Madyastha & Thulasiram, 1999) ocurridos durante el secado del material previo a la hidrodestilación, además de las reacciones químicas que pueden ocurrir durante la hidrodestilación (Babu *et al.*, 2004; Babu & Kaul, 2007). A este respecto, se han reportado transformaciones químicas de diversos terpenos como consecuencia de los efectos térmicos e hidrolíticos ocurridos en la HD. Las reacciones químicas producidas explicaron, en varios casos, las diferentes cantidades de CVV obtenidas cuando se utilizaban distintos métodos de extracción (Lucchesi *et al.*, 2007; Bendahou *et al.*, 2008; Riela *et al.*, 2008). Tomando en consideración las transformaciones provocadas por enzimas bacterianas durante el proceso de secado de algunas plantas (Croteau *et al.*, 1991; Madyastha & Thulasiram, 1999), en combinación con algunas reacciones de reordenamiento, transposición, deshidratación e isomerización de terpenos propuestas por otros investigadores (Riela *et al.*, 2008), y en función de las importantes diferencias en los porcentajes de *cis*-isopulegona, mentona y pulegona, las cuales se encontraron en concentraciones significativamente mayores por HS-SPME, y las de los óxidos de piperitona y piperitenona, cuyas concentraciones fueron significativamente mayores en el AE (Figura 9.8), es posible que *cis*-isopulegona, mentona y pulegona se conviertan en los óxidos de piperitona y piperitenona a través de la combinación de procesos representados en la figura 9.9.

molecular y de mayor polaridad, que tienen mayor probabilidad de ser adsorbidos por las capas de DVB y CAR, donde puede producirse competencia por los sitios de unión, que por la de solvente PDMS (Wercinski, 1999; Pawliszyn, 2012).

9.3.2- *Diferencias entre la composición de inflorescencias, tallos y hojas*

Pulegona fue el componente de mayor concentración en hojas, tallos e inflorescencias, aunque en concentraciones diferentes. Sin embargo, el resto de CVV mayoritarios fue diferente para cada parte aérea: óxido de carvona en hojas, limoneno y spatulenol en tallos y óxido piperitenona en flores.

Comparando los resultados obtenidos en las distintas partes aéreas de *C. odorum*, algunas de las diferencias más importantes fueron:

- (a) Se observaron diferencias importantes en el número de compuestos producidos por cada parte de la planta, 53 y 66 componentes hallados en flores y hojas respectivamente, frente a sólo 17 encontrados en los tallos.
- (b) El componente principal, pulegona, fue encontrado en mayores cantidades en hojas y tallos que en flores, mientras que las flores fueron la principal fuente de óxido de piperitenona y óxido de piperitona.
- (c) La producción de limoneno, spatulenol, mentona, *cis*-isopulegona, bicicloelemeno y biciclogeremacreno se encontró principalmente a los tallos.
- (d) Eucaliptol, dodecano, *cis*- α -terpineol, α - fenchil acetato, β -fenchil acetato y globulol se encontraron exclusivamente en inflorescencias.
- (e) Óxido de bisabolol A fue un componente exclusivo de los tallos.
- (f) δ -3-Careno, γ -terpineno, óxido *cis*-limoneno, 1-octenil-3-acetato, *trans*-anetol, α -cubebeno, α -ylangeno, α -elemeno, germacreno B, *epi*-biciclosesquifelandreno, α -amorfeno, γ -amorfeno, β -bisabolenol, cadina-1,4-dieno, α -calacoreno y δ -cadinol provinieron únicamente de las hojas.

No se encontraron estudios previos de caracterización diferencial de la composición de CVV en las partes aéreas de *C. odorum* por separado.

9.4- Caracterización de compuestos volátiles en *Clinopodium gilliesii*

Los CVV de *C. gilliesii* se caracterizaron por las técnicas de hidrodestilación y HS-SPME (Tabla 9.3). Las estructuras químicas de los componentes volátiles mayoritarios se muestran en la figura 9.10.

Tabla 9.3. Componentes volátiles hallados en *C. gilliesii* por análisis del aceite esencial y HS-SPME, usando una fibra DVB-CAR-PDMS 50/30 μm ; temperatura de extracción de 40 $^{\circ}\text{C}$; 10 minutos de equilibrio del HS y 10 minutos de exposición de la fibra en el HS. Se muestran valores promedios de tres determinaciones, cuyos CV fueron menores al 5 %.

Pico	tr ^a (min)	Compuesto ^b	KI ^c (Ex)	KI ^d (Lit)	% ^e				
					H. ^f	T. ^g	F. ^h	P.E. ⁱ	A.E. ^j
1	16,50	β -pineno	965	969	0,3 ^a	8,9 ^b	0,4 ^a	0,4 ^a	0,2 ^a
2	18,01	β -mirceno	987	983	0,4 ^c	ND ^a	0,7 ^d	0,4 ^c	0,1 ^b
3	19,37	sabineno	1006	1001	0,6 ^c	ND ^a	ND ^a	0,2 ^b	ND ^a
4	20,00	2,3,4,5-tetrahidroanisol	1015	1015	ND ^a	ND ^a	0,5 ^b	ND ^a	ND ^a
5	20,46	limoneno	1021	1025	1,7 ^b	3,6 ^c	5,9 ^d	0,4 ^a	0,3 ^a
6	20,58	eucaliptol	1023	1023	ND ^a	43,4 ^c	ND ^a	0,5 ^b	0,4 ^b
7	21,43	β -felandreno	1034	1035	0,3 ^b	ND ^a	ND ^a	ND ^a	0,1 ^b
8	22,20	<i>trans</i> - β -ocimeno	1044	1044	0,8 ^c	ND ^a	0,7 ^c	0,3 ^b	0,2 ^b
9	22,83	γ -terpineno	1053	1050	ND ^a	1,3 ^b	ND ^a	ND ^a	ND ^a
10	25,01	<i>p</i> -cimeneno	1082	1085	ND ^a	ND ^a	1,4 ^b	ND ^a	ND ^a
11	26,10	linalool	1096	1093*	2,6 ^b	1,5 ^a	2,7 ^b	1,4 ^a	2,7 ^b
12	28,47	mircenol	1133	1126	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	0,3 ^b
13	29,60	óxido de <i>trans</i> -limoneno	1143	1143	ND ^a	1,4 ^b	ND ^a	ND ^a	ND ^a
14	29,70	isomentona	1153	1153	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	0,1 ^b
15	30,69	mentona	1168	1166	0,4 ^b	3,0 ^c	0,2 ^b	ND ^a	0,2 ^b
16	30,73	lavandulol	1169	1170	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	0,1 ^b
17	31,30	<i>cis</i> -isopulegona	1177	1173	0,5 ^b	ND ^a	0,3 ^b	0,3 ^b	0,3 ^b
18	31,52	4-terpineol	1181	1182	0,7 ^b	ND ^a	ND ^a	ND ^a	0,4 ^b
19	31,71	isopinocarveol	1185	1183	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	0,1 ^b
20	32,04	<i>trans</i> -isopulegona	1189	1188	0,5 ^b	ND ^a	0,6 ^b	0,5 ^b	0,9 ^c
21	32,21	mirtanal	1192	1193	0,7 ^b	4,0 ^c	0,6 ^b	0,2 ^a	0,9 ^b
22	32,39	mirtenol	1195	1196	0,2 ^b	2,3 ^d	ND ^a	ND ^a	0,6 ^c
23	32,52	α -terpineol	1197	1196	0,3 ^b	ND ^a	0,9 ^c	0,8 ^c	ND ^a
24	32,64	dodecano	1199	1200	1,3 ^b	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a
25	32,77	<i>trans</i> -dihidrocarvona	1203	1201	ND ^a	0,5 ^c	ND ^a	0,2 ^b	0,6 ^c
26	33,07	<i>trans</i> -carveol	1211	1210	0,5 ^c	ND ^a	ND ^a	0,2 ^b	ND ^a
27	33,13	verbenona	1214	1212	0,9 ^b	ND ^a	2,0 ^c	0,8 ^b	ND ^a
28	33,25	4,7-dimetilbenzofurano	1218	1218	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	0,8 ^b
29	33,48	α -fenchil acetato	1225	1226	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	1,1 ^b
30	33,60	nerol	1229	1229	1,0 ^c	1,5 ^d	0,7 ^b	0,8 ^b	0,3 ^a
31	33,89	pulegona	1236	1233*	1,0 ^b	0,6 ^a	2,7 ^c	0,9 ^{a,b}	1,3 ^b
32	34,00	neral	1242	1242	0,9 ^a	1,9 ^b	0,9 ^a	0,7 ^a	1,7 ^b
33	34,39	piperitona óxido	1253	1259	16,1 ^c	3,2 ^a	3,4 ^a	7,3 ^b	18,1 ^d
34	34,67	carvona óxido	1263	1263	0,4 ^b	ND ^a	0,6 ^{b,c}	0,8 ^c	0,4 ^b
35	34,75	anisol	1265	1265	0,2 ^b	ND ^a	ND ^a	0,5 ^c	ND ^a
36	34,81	diosfenol	1267	1273	0,4 ^b	ND ^a	1,1 ^c	ND ^a	0,6 ^b
37	34,94	geranial	1271	1271	1,3 ^a	3,0 ^c	2,5 ^b	1,2 ^a	2,6 ^b
38	35,19	citronelil formiato	1279	1278	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	0,3 ^b
39	35,21	bornil acetato	1280	1280	0,3 ^b	ND ^a	0,7 ^c	0,1 ^b	0,1 ^b
40	35,44	1-butenil-tiofeno	1287	ND	3,0 ^b	5,7 ^d	4,3 ^c	3,0 ^b	0,3 ^a
41	35,63	sabinil acetato	1290	1291	1,1 ^c	ND ^a	0,9 ^c	ND ^a	0,3 ^b

Tabla 9.3. Continuación.

Pico	tr ^a (min)	Compuesto ^b	KI ^c (Ex)	KI ^d (Lit)	% ^e				
					H. ^f	T. ^g	F. ^h	P.E. ⁱ	A.E. ^j
42	35,65	N.I. **	1294		ND	ND	ND	ND	0,1
43	35,72	N.I. **	1296		ND	ND	ND	ND	0,5
44	35,76	timol	1297	1295*	0,9 ^c	ND ^a	1,2 ^c	0,1 ^b	0,8 ^c
45	36,03	N.I. **	1307		0,4	ND	0,4	ND	ND
46	36,17	N.I. **	1312		0,8	ND	ND	0,1	0,7
47	36,44	mirtenil acetato	1322	1322	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	0,9 ^b
48	36,49	δ-elemeno	1324	1325	0,6 ^{b,c}	ND ^a	0,9 ^c	0,4 ^b	ND ^a
49	36,60	α-metilcinnamaldehído	1328	1330	0,2 ^b	1,8 ^c	0,4 ^b	0,3 ^b	ND ^a
50	36,80	bicicloelemeno	1335	1334	3,0 ^d	ND ^a	2,9 ^d	2,4 ^c	0,6 ^b
51	36,96	piperitenona	1342	1339	0,5 ^{b,c}	ND ^a	1,4 ^d	0,8 ^c	0,3 ^b
52	37,14	α-cubebeno	1346	1345	0,3 ^b	ND ^a	0,9 ^c	0,1 ^b	0,1 ^b
53	37,24	citronelil acetato	1352	1353	0,5 ^{b,c}	ND ^a	0,3 ^b	0,1 ^b	0,8 ^c
54	37,52	neril acetato	1363	1364	0,2 ^b	ND ^a	0,5 ^b	ND ^a	0,3 ^b
55	37,68	óxido de piperitenona	1369	1369	10,2 ^b	1,3 ^a	12,8 ^c	20,0 ^e	17,4 ^d
56	37,74	isoledeno	1371	1373	ND ^a	ND ^a	1,1 ^b	ND ^a	ND ^a
57	37,88	α-ylangeno	1377	1377	0,6 ^b	ND ^a	0,9 ^b	0,7 ^b	ND ^a
58	38,02	geranil acetato	1382	1383	0,2 ^b	ND ^a	ND ^a	0,2 ^b	0,6 ^b
59	38,12	β-bourboneno	1386	1385	1,6 ^c	ND ^a	1,7 ^c	0,8 ^b	0,5 ^b
60	38,29	β-elemeno	1392	1391	0,8 ^c	ND ^a	0,9 ^c	0,8 ^c	0,4 ^b
61	38,40	α-copaeno	1396	1400	1,1	0,8	0,7	0,8	1,1
62	38,55	cis-jasmona	1402	1403	0,5 ^b	ND ^a	1,6 ^c	0,4 ^b	0,7 ^{b,c}
63	38,71	isolongifoleno	1409	1406	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	0,1 ^b
64	38,77	β-maaliemo	1411	1411	0,3 ^b	ND ^a	0,3 ^b	0,1 ^b	0,1 ^b
65	39,04	β-cariofileno	1421	1418	4,3 ^d	0,6 ^a	3,7 ^{c,d}	3,2 ^c	1,6 ^b
66	39,27	β-cubebeno	1432	1432	0,9 ^c	ND ^a	0,9 ^c	0,7 ^c	0,1 ^b
67	39,43	γ-elemeno	1437	1433	0,5 ^c	ND ^a	0,6 ^c	0,2 ^b	0,2 ^b
68	39,54	aromadendreno	1443	1446	1,7 ^d	ND ^a	1,7 ^d	1,0 ^c	0,2 ^b
69	39,64	α-gurjuneno	1448	1449	1,1 ^c	ND ^a	1,2 ^c	0,9 ^c	0,2 ^b
70	39,80	trans-β-farneseno	1454	1451	0,4 ^b	ND ^a	1,1 ^c	1,1 ^c	0,9 ^c
71	39,90	α-elemeno	1458	1460	0,7 ^b	ND ^a	ND ^a	ND ^a	0,3 ^b
72	40,13	γ-muuroleno	1468	1469	1,2 ^c	ND ^a	1,3 ^c	1,3 ^c	0,1 ^b
73	40,38	epi-biciclosesquifelandreno	1476	1471	0,2 ^b	ND ^a	0,2 ^b	ND ^a	0,1 ^b
74	40,45	α-amorfenol	1482	1481	0,8 ^c	ND ^a	0,8 ^c	0,7 ^c	0,2 ^b
75	40,59	germacreno D	1487	1485	3,1 ^c	ND ^a	2,3 ^b	4,5 ^d	2,3 ^b
76	40,63	γ-amorfenol	1489	1488	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	0,3 ^b
77	40,80	epizonareno	1496	1497	0,4 ^a	1,2 ^b	1,0 ^b	0,7 ^{a,b}	0,1 ^a
78	41,00	biciclogermacreno	1503	1499	8,6 ^d	1,1 ^a	6,1 ^c	9,2 ^d	4,6 ^b
79	41,06	α-farneseno	1507	1509	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	0,5 ^b
80	41,21	β-bisaboleno	1513	1514	0,2 ^b	ND ^a	0,3 ^b	0,8 ^c	0,1 ^b
81	41,39	γ-cadineno	1521	1520	2,4 ^c	1,5 ^b	2,8 ^d	3,2 ^d	0,5 ^a
82	41,58	δ-cadineno	1527	1525	4,4 ^b	2,2 ^a	4,3 ^b	5,2 ^c	4,6 ^{b,c}
83	41,63	cadina-1,4-dieno	1531	1532	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	0,2 ^b
84	41,82	α-cadineno	1538	1538	0,2 ^b	ND ^a	0,2 ^b	ND ^a	0,1 ^b
85	41,94	elemol	1543	1542	0,5 ^c	ND ^a	0,6 ^{c,d}	0,8 ^d	0,2 ^b
86	42,15	N.I. **	1552		ND	ND	ND	ND	0,2
87	42,42	cis-nerolidol	1563	1562	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	1,0 ^b
88	42,60	germacren-4-ol	1571	1576	4,3 ^c	2,1 ^a	4,5 ^c	11,5 ^d	3,5 ^b
89	42,86	1-endo-bourbonanol	1581	1575	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	0,5 ^b
90	42,94	spatulanol	1582	1582	0,2 ^b	ND ^a	ND ^a	0,7 ^c	2,9 ^d
91	43,08	viridiflorol	1590	1590	2,5 ^c	1,6 ^b	2,0 ^{b,c}	3,3 ^d	0,8 ^a
92	43,33	N.I. **	1601		ND	ND	ND	ND	1,1
93	43,52	β-oplopenona	1609	1608	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	0,2 ^b
94	43,64	N.I. **	1614		ND	ND	ND	ND	0,2
95	43,80	agarospirol	1621	1620	ND ^a	ND ^a	0,2 ^b	ND ^a	0,1 ^b
96	43,92	τ-cadinol	1627	1625	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	0,1 ^b
97	44,05	τ-muurolol	1633	1632	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	0,2 ^b
98	44,14	N.I. **	1636		ND	ND	ND	ND	0,1
99	44,39	δ-cadinol	1647	1645	0,2 ^b	ND ^a	0,2 ^b	0,5 ^b	3,5 ^c
100	44,49	α-cadinol	1652	1556	0,1 ^b	ND ^a	0,2 ^b	0,5 ^c	1,6 ^d
101	44,61	β-eudesmol	1657	1658	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	0,2 ^b

Tabla 9.3. Continuación.

Pico	t _R ^a (min)	Compuesto ^b	KI ^c (Ex)	KI ^d (Lit)	% ^e				
					H. ^f	T. ^g	F. ^h	P.E. ⁱ	A.E. ^j
102	44,75	α -muurolol	1663	1666	ND ^a	ND ^a	0,2 ^b	ND ^a	4,3 ^c
103	45,55	famesol	1699	1699	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	0,8 ^b
Total					100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
% Compuestos Identificados					97,1	100,0	98,4	98,3	92,1
% Área Identificada					98,9	100,0	99,6	99,9	97,1

^a Tiempo de retención; ^b Identificados por GC-MS; ^c Índices de retención de Kovat's experimentales; ^d Índices de retención de Kovat's de literatura; ^e Cuantificados por GC-FID, letras distintas indican diferencias significativas del ANOVA con test Tukey ($p < 0,05$); ^f Hojas; ^g Tallos; ^h Flores; ⁱ Planta entera; ^j Aceite esencial. *KI Determinado usando estándares de referencia. ** Compuesto no identificado; ND: No Detectado.

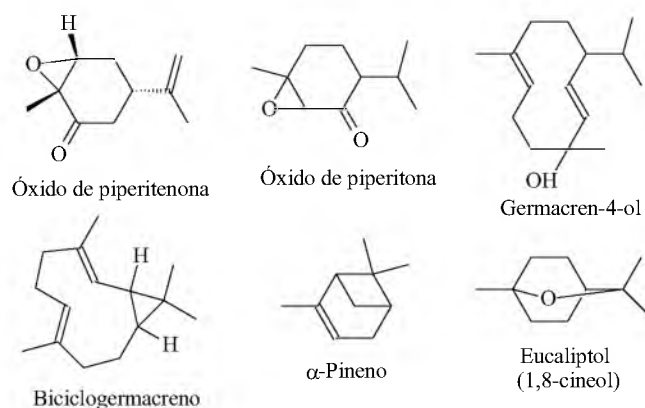


Figura 9.10. Algunos componentes volátiles hallados en *C. gilliesii* por análisis del aceite esencial y por muestreo mediante HS-SPME.²

9.4.1- Comparación entre el análisis por HS-SPME y del aceite esencial

A partir del AE de *C. gilliesii* se hallaron 88 componentes diferentes, 81 de los cuales fueron identificados (92,1 %), lo que corresponde al 97,1 % del área total del cromatograma, mientras que por HS-SPME de planta aérea entera se encontraron 59 componentes diferentes, 58 de los cuales fueron identificados (98,3 %), lo que corresponde al 99,9 % del área total del cromatograma. Esta situación representa una caracterización de CVV un 34 % mayor en el AE (Tabla 9.3).

Comparando los resultados obtenidos para el análisis del AE de *C. gilliesii* reportado en la literatura (Zygadlo *et al.*, 1993; Muschietti *et al.*, 1996; Molina *et al.*, 2002; Viturro *et al.*, 2007), se observan importantes discrepancias en cuanto a los componentes mayoritarios según la región geográfica (Zygadlo *et al.*, 1993; Muschietti *et al.*, 1996; Viturro *et al.*, 2007) y el estadio de crecimiento de la planta (Molina *et al.*, 2002). En este caso, los componentes principales presentes en el AE fueron óxido de piperitona y óxido de piperitenona, mientras

² Fuente de las estructuras químicas: Base de datos NIST: <http://webbook.nist.gov/chemistry/>

que por HS-SPME fueron óxido de piperitenona, germacren-4-ol, biciclogermacreno y óxido piperitona.

Las diferencias observadas entre los resultados obtenidos por HS-SPME de partes aéreas frescas y a partir del análisis del AE podría explicarse a través de procesos enzimáticos y cambios microbiológicos ocurridos durante el proceso de secado (Croteau *et al.*, 1991, Madyastha y Thulasiram 1999). Por otra parte, es importante tener en cuenta que, a excepción de los componentes encontrados sólo por HS-SPME y no en el aceite esencial (sabineno, α -terpineol, *trans*-carveol, verbenona, anisol, δ -elemeno, α -metilcinnamaldehído, α -ylangeno), las diferencias también podrían explicarse por diferencias en las afinidades del recubrimiento de la fibra por los CVV, esto es, a diferencias en los coeficientes de partición entre la fibra y el HS (Wercinski, 1999; Pawliszyn, 2012).

9.4.2- *Diferencias entre la composición de inflorescencias, tallos y hojas*

Una de las mayores ventajas de la técnica de HS-SPME es la pequeña cantidad de muestra requerida para la realización de las determinaciones analíticas, mientras que para obtener los AE, son necesarias grandes cantidades de muestra para obtener pequeñas cantidades de aceite (Mohammadhosseini *et al.*, 2013; Kovacevic *et al.*, 2016; Wesolowska & Jadcak, 2016). Típicamente, se requieren 0,5 - 1 kg de muestra para obtener una muestra adecuada para realizar los análisis (Viturro *et al.*, 2007). Esta diferencia hace posible que los análisis por HS-SPME sean más rápidos en comparación con los que requieren de la obtención del AE, además del tiempo necesario para separar grandes cantidades de las diferentes partes de la planta. Por esa razón, la caracterización de CVV en tallos, hojas e inflorescencias se realizó por HS-SPME.

Óxido de piperitona y óxido de piperitenona fueron los componentes mayoritarios de hojas, mientras que en inflorescencias fue óxido de piperitenona. Sin embargo en tallos, los componentes mayoritarios fueron eucaliptol y α -pineno, totalmente diferentes que los hallados en hojas e inflorescencias (Tabla 9.3).

Comparando los resultados obtenidos en las diferentes partes aéreas de *C. gilliesii*, algunas de las diferencias más importantes fueron:

(a) Tanto las inflorescencias como las hojas fueron responsables de la mayor cantidad de CVV (69 y 63 respectivamente), mientras que los tallos contribuyeron con un número considerablemente menor (sólo 26 compuestos).

- (b) Óxido de piperitona y óxido de piperitenona fueron encontrados en mayores cantidades en hojas y flores que en tallos.
- (c) Las flores fueron la principal fuente de óxido de piperitenona, mientras que las hojas, de óxido de piperitona.
- (d) Las cantidades de α -pineno, mentona, mirtenal, mirtenol, nerol, neral, geranial y epizonareno, fueron mayores en los tallos.
- (e) β -Felandreno, 4-terpineol, dodecano, *trans*-carveol, anisol, acetato de geranilo, α -elemeno y spatulenol fueron hallados únicamente por las hojas.
- (f) 2,3,4,5-Tetrahidroanisol, *p*-cimeneno, isoledeno, agarospirol y α -muurolol fueron encontrados únicamente en las flores.
- (g) Eucaliptol, γ -terpineno, óxido de *trans*-limoneno y *trans*-dihidrocarvona se observaron exclusivamente en tallos.

No se encontraron estudios previos de caracterización diferencial de la composición de volátiles en las partes aéreas de *C. gilliesii* por separado.

9.5- Comparación de la composición de volátiles en las dos especies de *Clinopodium*

A partir de los datos de los componentes volátiles identificados en las dos especies de *Clinopodium* estudiadas, correspondientes a los análisis por HS-SPME de las partes aéreas combinadas, se pueden observar algunas similitudes y diferencias interesantes:

- (a) Los componentes principales de cada especie fueron diferentes: en el caso de *C. gilliesii*, los componentes principales fueron óxido de piperitenona, germacren-4-ol, biciclogermacreno, óxido de piperitona y δ -cadineno, mientras que en el caso de *C. odorum* los componentes principales fueron pulegona, *cis*-isopulegona y mentona.
- (b) De los 78 CVV identificados, 34 se encontraron en las dos especies, 23 de los cuales tuvieron concentraciones similares: β -pineno, β -mirceno, sabineno, *trans*- β -ocimeno, linalool, *trans*-isopulegona, α -terpineol, timol, δ -elemeno, α -metilcinnamaldehído, piperitenona, α -cubebeno, α -ylangeno, β -bourboneno, β -elemeno, α -copaeno, β -cubebeno, γ -elemeno, aromadendreno, α -gurjuneno, α -amorfenol, espatulenol y δ -cadinol.

(c) De los 34 CVV identificados en ambas especies, tuvieron concentraciones marcadamente diferentes: limoneno, *cis*-isopulegona, pulegona, óxido de piperitona, bicicloelemeno, óxido de piperitenona, β -cariofileno, γ -muuroleno y biciclogermacreno.

(c) De los 78 CVV identificados, 24 sólo se hallaron en *C. gilliessi*: eucaliptol, mirtenal, *trans*-dihidrocarvona, *trans*-carveol, verbenona, nerol, neral, óxido de carvona, anisol, geranial, bornil acetato, 1-butenil-tiofeno, citronelil acetato, geranil acetato, *cis*-jasmona, β -maaliene, *trans*- β -farneseno, epizonareno, β -bisaboleno, γ -cadineno, elemol, germacren-4-ol, viridiflorol y α -cadinol.

(d) De los 78 CVV, 20 sólo se hallaron en *C. odorum*: α -pineno, δ -3-careno, 1-octenil-3-acetato, óxido de *cis*-limoneno, isomentona, mentona, diosfenol, *trans*-anetol, *trans*-sabinil acetato, *cis*-sabinil acetato, isolongifoleno, calareno, α -elemeno, β -salineno, γ -amorfeno, γ -cadineno, β -cadineno, α -cadineno, α -calacoreno y globulol.

9.6- Aplicación de la metodología de HS-SPME desarrollada para la comparación de la composición de volátiles en *C. odorum* silvestre y plantas micropropagadas *in vitro* de la misma especie

La tabla 9.4 muestra los resultados de la composición de CVV en *C. odorum* silvestre y cultivadas *in vitro* por HS-SPME.

Pulegona, *cis*-isopulegona y mentona fueron los componentes mayoritarios en todas las plantas, aunque las cantidades fueron diferentes:

(a) En el caso de pulegona, las menores cantidades se encontraron en la planta silvestre y las que crecieron en los medios WP plus PGRs, mientras que en el resto de las plantas micropropagadas su contenido fue mayor, además, no se observaron diferencias significativas entre las cantidades encontradas en la planta silvestre y las que se cultivaron en los medios WP plus PGRs, MS $1/2$ (Control) o SH plus PGRs.

(b) En cuanto a *cis*-isopulegona, las menores concentraciones se encontraron en la planta silvestre y la que creció en medio B₅ $1/2$ (PGR), mientras que en el resto de las plantas micropropagadas su contenido fue mayor.

(c) En el caso de mentona, las menores concentraciones se encontraron en la planta silvestre y la que creció en medio B₅ 0 $1/2$ (Control), mientras que en el resto de las plantas

micropropagadas su contenido fue mayor, además, no se observaron diferencias significativas entre las cantidades encontradas en la planta silvestre y las que se cultivaron en los medios B₅ 0 1/2 (Control), M_{1/2} plus PGR o SH plus PGRs.

En las plantas silvestres se hallaron, además, cantidades apreciables de germacreno D, biciclogermacreno, isomentona, δ -cadineno, linalool, piperitona óxido y limoneno. En cambio, en las plantas cultivadas *in vitro*, isomentona se encontró en cantidades apreciables en todas ellas, aunque en diversas cantidades, mientras que linalool se identificó en cantidades apreciables en todas excepto las que crecieron en B₅ 1/2 plus PGRs, aunque en diversas cantidades porcentuales. La composición del resto de CVV también fue variable, observándose diferencias significativas en las cantidades encontradas de δ -3-careno, *trans*- β -ocimeno, diosfenol, isobornil acetato, α -metil cinnamaldehído, bicicloelemeno, α -cubebeno, α -ylangeno, β -bourboneno, β -elemeno, α -copaeno, γ -elemeno, aromadendreno, α -gurjuneno, calareno, α -elemeno, γ -muuroleno, α -amorfeno, germacreno D, γ -amorfeno, biciclogermacreno, γ -cadineno, β -cadineno, α -calacoreno, spatulenol y δ -cadinol.

Cuando se realizó el Análisis de Componentes Principales (PCA) sobre los componentes con porcentajes mayores a 1 % de la tabla 9.4, se obtuvieron dos componentes principales, las cuales resumieron el 67,9 % de la varianza total (Figura 9.11). Como se puede observar en el gráfico, la especie silvestre se separa del resto respecto de la componente 1, aunque, respecto de la componente 2, se acerca a las plantas cultivadas en los medios WP₀ y WP plus PGRs.

Tabla 9.4. Compuestos orgánicos volátiles encontrados por HS-SPME en *C. odorum* silvestre e *in vitro* micro propagadas en diferentes medios. Se muestran valores promedios de tres determinaciones, cuyos coeficientes de variación fueron menores al 5 %.

Pico	Compuesto ¹	Planta silvestre	MS _{1/2}	MS _{1/2} (PGR)	WP	% ² WP (PGR)	B _{5 0 1/2}	B _{5 1/2} (PGR)	SH	SH (PGR)
1	No Identificado	ND	ND	ND	ND	1,2	ND	ND	ND	ND
2	No Identificado	ND	ND	1,5	0,2	0,1	ND	0,6	ND	0,5
3	No Identificado	ND	0,2	ND	0,1	0,6	0,6	ND	0,1	ND
4	2-hexenal	^a ND	0,3 ^e	0,5 ^f	0,1 ^b	0,6 ^g	^a ND	0,2 ^d	0,2 ^c	^a ND
5	α-pineno	0,2 ^{b, c}	0,1 ^{a, b}	0,2 ^{b, c}	0,3 ^c	0,2 ^c	0,1 ^{b, c}	2,3 ^d	^a ND	0,06 ^{a, b}
6	β-pineno	0,3 ^{f, g}	^a ND	0,2 ^{e, f}	0,1 ^{c, d}	0,2 ^{c, d, e}	0,3 ^g	0,2 ^{d, e}	0,1 ^{b, c}	0,05 ^{a, b}
7	β-mirceno	0,3 ^d	0,2 ^{b, c}	0,2 ^c	0,3 ^d	0,1 ^{a, b, c}	0,2 ^{b, c}	0,8 ^e	0,1 ^{a, b}	0,05 ^a
8	sabineno	0,3 ^{e, f}	0,1 ^{b, c}	0,2 ^{b, c, d}	^a ND	0,2 ^{d, e}	0,2 ^{c, d}	0,3 ^f	^a ND	0,07 ^{a, b}
9	δ-3-careno	0,3 ^d	0,1 ^b	0,1 ^b	^a ND	0,2 ^c	0,05 ^{a, b}	^a ND	^a ND	0,08 ^b
10	limoneno	1,2 ^d	0,3 ^{a, b}	0,5 ^b	1,0 ^d	0,7 ^c	0,1 ^a	0,4 ^b	0,3 ^b	0,4 ^b
11	trans-β-ocimeno	0,5 ^e	0,1 ^b	^a ND	0,2 ^c	0,1 ^b	0,1 ^b	0,3 ^d	0,1 ^b	0,1 ^b
12	linalool	1,4 ^{a, b}	2,2 ^c	1,6 ^{b, c}	2,3 ^c	1,9 ^{b, c}	1,8 ^{b, c}	0,8 ^a	1,4 ^{a, b}	1,6 ^{a, b, c}
13	1-octenil-3-acetato	0,2 ^b	0,1 ^a	^a ND	^a ND	^a ND	0,2 ^b	0,3 ^c	0,04 ^a	^a ND
14	óxido de cis-limoneno	0,05 ^b	0,1 ^b	^a ND	^a ND	0,08 ^b	^a ND	^a ND	0,05 ^b	^a ND
15	isomentona	2,2 ^a	3,9 ^{b, c, d}	2,0 ^a	4,1 ^{c, d}	4,4 ^d	2,1 ^a	3,5 ^{b, c}	3,2 ^b	2,1 ^a
16	mentona	9,1 ^a	14,0 ^h	9,8 ^a	13,2 ^b	13,0 ^b	9,3 ^a	12,8 ^b	13,3 ^b	10,5 ^a
17	cis-isopulegona	12,1 ^a	14,5 ^b	16,4 ^{b, c}	16,1 ^{b, c}	17,3 ^{c, d}	18,6 ^d	10,2 ^a	16,8 ^{c, d}	17,0 ^{c, d}
18	trans-isopulegona	0,2 ^{a, b, c}	0,2 ^c	0,2 ^{a, b, c}	0,4 ^d	0,1 ^a	0,2 ^c	0,2 ^c	0,1 ^{a, b}	0,2 ^{b, c}
19	α-terpineol	0,4 ^c	0,7 ^d	0,4 ^c	0,4 ^c	0,3 ^b	1,1 ^e	0,1 ^a	0,3 ^b	1,1 ^e
20	dodecano	^a ND	0,1 ^b	0,2 ^c	^a ND	^a ND	0,3 ^d	0,09 ^b	^a ND	0,3 ^d
21	cis-α-terpineol	^a ND	0,3 ^b	^a ND	0,3 ^b	^a ND	^a ND	^a ND	0,09 ^a	^a ND
22	β-fenchil acetato	^a ND	^a ND	^a ND	^a ND	^a ND	0,1 ^c	0,1 ^b	0,1 ^b	0,2 ^c
23	pulegona	52,0 ^a	57,0 ^{a, b}	60,0 ^{b, c}	56,0 ^{a, b}	53,0 ^a	59,0 ^{b, c}	64,0 ^c	59,0 ^{b, c}	57,7 ^{a, b}
24	piperitona óxido	1,3 ^c	0,4 ^{a, b}	0,3 ^a	1,3 ^c	0,5 ^b	0,4 ^{a, b}	0,4 ^{a, b}	0,3 ^{a, b}	0,3 ^a
25	carvona óxido	^a ND	0,3 ^b	0,4 ^c	^a ND	0,4 ^{c, d}	^a ND	^a ND	0,5 ^d	0,3 ^c
26	diosfenol	0,4 ^c	^a ND	^a ND	^a ND	^a ND	0,2 ^b	^a ND	^a ND	^a ND
27	isobornil acetato	^a ND	0,3 ^d	0,1 ^{b, c}	0,4 ^c	0,1 ^{b, c}	0,2 ^c	0,1 ^{b, c}	0,09 ^b	0,4 ^c
28	trans-anetol	0,2 ^b	0,2 ^b	0,2 ^b	0,1 ^a	0,08 ^a	0,2 ^b	0,2 ^b	0,1 ^{a, b}	0,2 ^b
29	trans-sabinil acetato	0,1 ^b	0,1 ^b	0,1 ^{a, b}	0,1 ^b	0,02 ^a	0,06 ^{a, b}	0,2 ^c	0,2 ^c	^a ND
30	cis-sabinil acetato	0,2 ^{a, b}	0,3 ^{b, c}	0,2 ^{a, b}	0,4 ^c	0,3 ^{b, c}	0,4 ^{b, c}	^a ND	^a ND	0,4 ^{b, c}
31	timol	0,3 ^d	0,2 ^c	0,1 ^b	0,07 ^{a, b}	^a ND	0,2 ^c	0,1 ^b	0,01 ^a	0,2 ^{c, d}
32	carvacrol	^a ND	0,05 ^b	0,02 ^{a, b}	0,01 ^{a, b}	^a ND	0,05 ^b	0,05 ^b	^a ND	^a ND
33	No Identificado	0,1	0,1	0,05	0,1	0,07	0,09	ND	0,04	0,2
34	δ-clemeno	0,2 ^{c, d}	0,1 ^{a, b, c, d}	0,06 ^a	0,09 ^{a, b}	0,2 ^d	0,08 ^{a, b}	0,1 ^{a, b, c}	0,06 ^a	0,15 ^{b, c, d}

Tabla 9.4. Continuación.

Pico	Compuesto ¹	% ²								
		Planta silvestre	MS _{1/2}	MS _{1/2} (PGR)	WP	WP (PGR)	B _{5 0 1/2}	B _{5 1/2} (PGR)	SH	SH (PGR)
35	α -metilcinnamaldehído	0,2 ^b	^a ND	^a ND	^a ND	^a ND	^a ND	^a ND	^a ND	^a ND
36	bicicloelemeno	1,0 ^e	0,2 ^c	0,2 ^c	0,05 ^{a, b}	0,09 ^{a, b, c}	0,1 ^{b, c}	^a ND	0,1 ^{b, c}	0,3 ^d
37	piperitenona	0,3 ^{a, b}	0,3 ^{b, c}	0,3 ^{b, c}	0,2 ^{a, b}	0,2 ^{a, b}	0,3 ^{b, c}	0,05 ^a	0,2 ^{a, b}	0,5 ^c
38	α -cubebeno	0,3 ^e	0,15 ^{c, d}	0,09 ^{b, c}	0,05 ^{a, b}	0,04 ^{a, b}	0,1 ^{b, c}	^a ND	0,03 ^{a, b}	0,2 ^d
39	piperitenona óxido	0,1 ^b	0,08 ^{a, b}	0,06 ^{a, b}	0,04 ^{a, b}	0,04 ^{a, b}	0,05 ^{a, b}	^a ND	0,03 ^{a, b}	0,1 ^b
40	α -ylangeno	0,3 ^b	^a ND	^a ND	^a ND	^a ND	^a ND	^a ND	^a ND	^a ND
41	β -bourboneno	0,3 ^b	^a ND	^a ND	^a ND	^a ND	^a ND	^a ND	^a ND	0,04 ^a
42	β -elemeno	0,5 ^c	0,1 ^{a, b}	0,09 ^{a, b}	0,05 ^a	0,08 ^{a, b}	0,1 ^{a, b}	0,05 ^a	0,05 ^a	0,2 ^b
43	α -copaeno	0,2 ^d	0,1 ^c	0,05 ^{a, b, c}	0,07 ^{a, b, c}	0,03 ^{a, b}	0,05 ^{a, b, c}	0,08 ^{a, b, c}	0,02 ^a	0,09 ^{b, c}
44	isolongifoleno	0,1 ^c	^a ND	^a ND	^a ND	0,09 ^b	^a ND	^a ND	^a ND	^a ND
45	β -cariofileno	0,6 ^{a, b}	0,9 ^{a, b, c}	1,4 ^{c, d}	0,6 ^{a, b}	1,0 ^{b, c}	0,9 ^{a, b, c}	0,3 ^a	0,8 ^{a, b, c}	1,7 ^d
46	β -cubebeno	0,5 ^d	0,1 ^c	0,1 ^{b, c}	0,08 ^{a, b}	0,08 ^{a, b}	0,1 ^{b, c}	0,04 ^a	0,07 ^{a, b}	0,2 ^c
47	γ -elemeno	0,2 ^b	0,04 ^a	0,03 ^a	^a ND	0,05 ^a	0,05 ^a	^a ND	0,02 ^a	0,04 ^a
48	aromadendreno	0,5 ^d	0,08 ^{b, c}	0,08 ^{b, c}	^a ND	0,04 ^{a, b}	0,03 ^a	^a ND	0,04 ^{a, b}	0,1 ^c
49	dehidroaromadendreno	^a ND	^a ND	0,05 ^b	^a ND	^a ND	^a ND	^a ND	^a ND	0,06 ^b
50	α -gurjuneno	0,5 ^c	0,09 ^b	0,03 ^{a, b}	^a ND	^a ND	0,03 ^{a, b}	^a ND	0,05 ^{a, b}	0,04 ^{a, b}
51	calareno	0,3 ^d	0,1 ^{b, c}	0,1 ^{b, c}	0,1 ^{b, c}	0,05 ^{a, b}	0,1 ^{b, c}	^a ND	0,05 ^{a, b}	0,1 ^c
52	α -elemeno	0,2 ^b	^a ND	0,01 ^a	^a ND	^a ND	^a ND	^a ND	^a ND	^a ND
53	γ -muuroleno	0,7 ^c	0,1 ^{a, b}	0,08 ^a	0,1 ^{a, b}	0,06 ^a	0,1 ^{a, b}	0,09 ^{a, b}	0,08 ^a	0,2 ^b
54	<i>epi</i> -biciclosesquifelandreno	^a ND	^a ND	0,01 ^a	^a ND	0,1 ^b	^a ND	^a ND	^a ND	0,02 ^a
55	β -selineno	0,1 ^{a, b}	0,1 ^{b, c}	0,1 ^{b, c}	0,09 ^{a, b}	0,09 ^{a, b}	0,1 ^{a, b}	0,08 ^a	0,09 ^{a, b}	0,2 ^c
56	α -amorfenó	0,6 ^b	^a ND	^a ND	^a ND	^a ND	^a ND	^a ND	^a ND	^a ND
57	germacreno D	2,9 ^f	0,4 ^{b, c}	0,5 ^d	0,2 ^a	0,2 ^{a, b}	0,4 ^{c, d}	0,18 ^a	0,3 ^{b, c}	0,7 ^e
58	γ -amorfenó	0,6 ^c	0,2 ^{b, c, d}	0,1 ^{a, b, c}	0,2 ^{c, d}	0,1 ^{a, b}	0,1 ^{a, b, c}	0,2 ^{a, b, c, d}	0,1 ^a	0,2 ^d
59	biciclogermacreno	2,4 ^d	0,3 ^b	0,4 ^b	0,2 ^{a, b}	0,2 ^{a, b}	0,3 ^{a, b}	0,1 ^a	0,2 ^{a, b}	0,5 ^c
60	γ -cadineno	0,2 ^c	^a ND	0,02 ^a	0,09 ^b	^a ND	^a ND	^a ND	^a ND	^a ND
61	β -cadineno	0,8 ^b	0,2 ^a	0,15 ^a	^a ND	0,07 ^a	0,1 ^a	0,09 ^a	0,1 ^a	0,2 ^a
62	δ -cadineno	1,4 ^c	0,2 ^{a, b}	0,2 ^a	0,16 ^a	0,2 ^a	0,2 ^a	0,1 ^a	0,2 ^a	0,3 ^b
63	cadina-1,4-dieno	^a ND	^a ND	0,03 ^b	^a ND	^a ND	^a ND	^a ND	^a ND	0,05 ^b
64	α -cadineno	0,1 ^c	0,06 ^{a, b}	0,04 ^{a, b}	^a ND	0,01 ^a	0,04 ^{a, b}	^a ND	0,02 ^{a, b}	0,09 ^{b, c}
65	α -calacoreno	0,3 ^b	^a ND	^a ND	^a ND	0,3 ^c	^a ND	^a ND	^a ND	^a ND
66	No Identificado	0,2	ND	ND	ND	0,03	ND	ND	ND	ND
67	spatulenol	0,06 ^b	^a ND	^a ND	^a ND	^a ND	^a ND	^a ND	^a ND	^a ND
68	No Identificado	0,08	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
69	δ -cadinol	0,15 ^b	^a ND	^a ND	^a ND	^a ND	^a ND	^a ND	^a ND	^a ND

Tabla 9.4. Continuación.

Pico	Compuesto ¹	Planta silvestre	MS _{1/2}	MS _{1/2} (PGR)	WP	% ² WP (PGR)	B _{5 0 1/2}	B _{5 1/2} (PGR)	SH	SH (PGR)
70	α -cadinol	^a ND	^a ND	^a ND	0,1 ^b	0,08 ^b	^a ND	0,1 ^b	0,03 ^a	0,02 ^a
71	No Identificado	ND	ND	ND	ND	0,03	ND	ND	ND	ND
72	No Identificado	ND	ND	ND	0,3	ND	ND	ND	ND	ND
73	No Identificado	ND	ND	ND	ND	0,03	ND	ND	ND	ND
74	No Identificado	ND	ND	ND	ND	0,2	ND	ND	ND	ND

¹ Identificados por GC-MS; ² Cuantificados por GC-FID; ND: Compuesto No Detectado; ANOVA con test Tukey; letras distintas indican diferencias significativas.

La figura 9.12 presenta el dendograma correspondiente a la evolución del agrupamiento de conglomerados en función de la distancia Euclídea a las concentraciones de los CVV presentes en cantidades porcentuales mayores al 1 % de la tabla 9.4, usando como criterio de clasificación las distintas plantas estudiadas. Como se puede observar, la planta silvestre se separa del resto, y las plantas cultivadas en WP₀ y WP plus PGRs son las que más se acercan a la silvestre. Por otro lado, las plantas que crecieron en medio B5_{1/2} plus PGRs son las que más se alejaron de la silvestre. Esto también se observa en el gráfico de PCA.

Las diferencias halladas en la composición de CVV demuestran que la biosíntesis y la emisión de volátiles de las plantas *in vitro* de *C. odorum* es un proceso regulado por la composición de nutrientes en los medios y de los reguladores de crecimiento, del mismo modo que ocurre con otras características fisiológicas y morfológicas de las plantas reportadas (Díaz *et al.*, 2012). En este sentido, la rapidez con que un tejido crece y la magnitud y calidad de las respuestas morfogenéticas, están fuertemente influenciadas por el tipo y concentración de nutrientes suministrados durante el crecimiento (Díaz *et al.*, 2012). Los beneficios potenciales de optimizar los nutrientes de los medios de cultivo para lograr una respuesta particular, están bien documentados en una amplia gama de especies y aplicaciones (Palacio *et al.*, 2008; Prins *et al.*, 2010; de Vasconcelos Cabral, 2011; Díaz *et al.*, 2012; Akram & Ashraf, 2013; Ferrari *et al.*, 2013; Vacheron *et al.*, 2013; Khan *et al.*, 2016). Adicionalmente, teniendo en cuenta que la biosíntesis de CVV está ligada al metabolismo primario (Avato *et al.*, 2005), la producción de CVV también se ve afectada por la composición del medio de desarrollo y por el método de producción (Avato *et al.*, 2005; Argyropoulou *et al.*, 2007; Ghasemzadeh *et al.*, 2016; Khodakovskaya *et al.*, 2013). En este caso, la dependencia de la producción de CVV con la composición de los medios de cultivo fue diferente de cada compuesto en particular. Por ejemplo, pulegona mostró una mayor sensibilidad a los medios de composición de nutrientes, ya que su biosíntesis se vio favorecida con bajas concentraciones de sal, como se observa a partir de su mayor concentración en los medios MS y B5 (medios salinos de intensidad media), aunque fue independiente de la adición de PGR, mientras que mentona fue más independiente de la composición del medio, lo cual se ve reflejado en el hecho de que fue el CVV predominante en la mayoría de los medios estudiados, con o sin la adición de reguladores de crecimiento (Tabla 9.4).

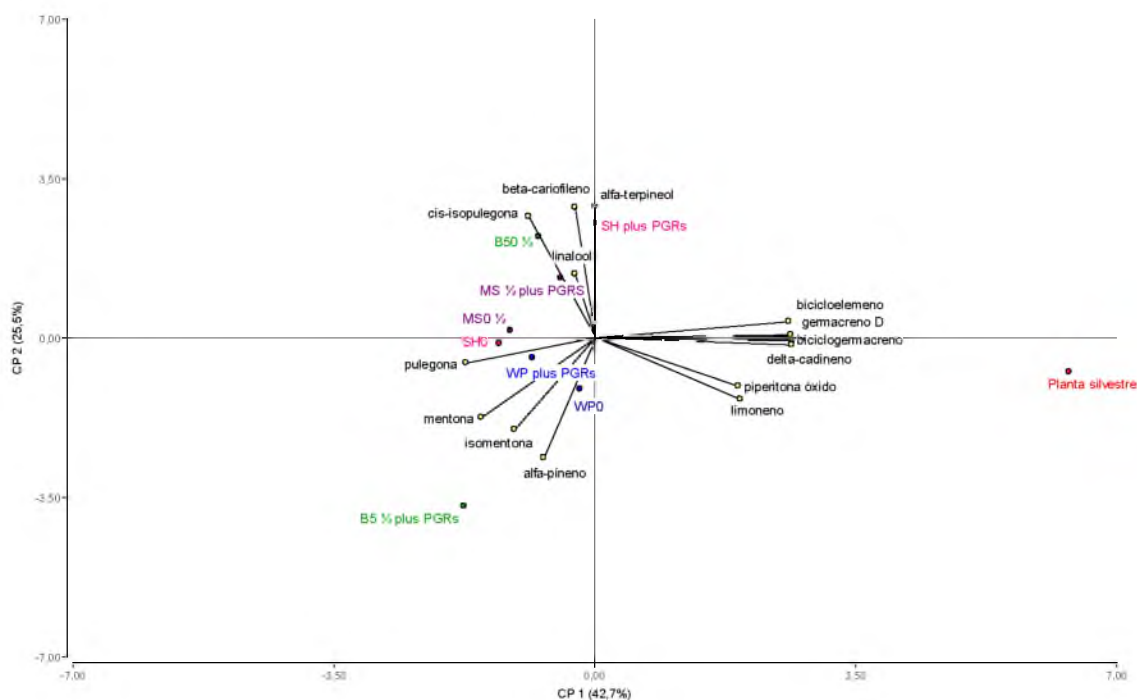


Figura 9.11. Gráfico de los componentes principales 1 y 2 rotados, resultantes del PCA sobre la matriz de correlación de los CVV presentes en *C. odorum* silvestre y micropropagadas *in vitro*.

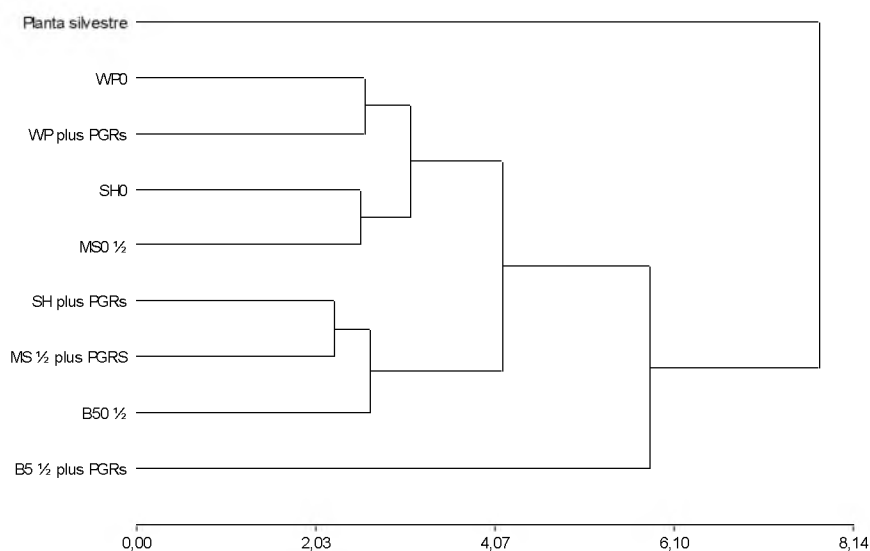


Figura 9.12. Dendrograma obtenido al realizar un Análisis por Conglomerados jerárquicos con el método de encadenamiento promedio y distancia Euclídea sobre la base de la variedad de CVV presentes en *C. odorum* silvestre y cultivadas *in vitro*.

Capítulo 10

Estudio de caracterización de compuestos volátiles en especies del género *Origanum* (Lamiaceae), de aceptabilidad sensorial y correlación químico-sensorial.

-
- 10.1- Introducción.
 - 10.2- Optimización del muestreo por HS-SPME.
 - 10.2.1- Selección del tipo de fibra SPME.
 - 10.2.2- Selección de la temperatura de trabajo.
 - 10.2.3- Selección del tiempo de equilibrado del HS y de exposición de la fibra.
 - 10.3- Caracterización de compuestos volátiles en diferentes tipos de orégano cultivado en Córdoba, Argentina.
 - 10.3.1- Caracterización de compuestos volátiles en *Origanum x majoricum* Cambessedes.
 - 10.3.1.1- Comparación entre el análisis por HS-SPME y del aceite esencial.
 - 10.3.1.2- Diferencias entre la composición de inflorescencias y hojas.
 - 10.3.2- Caracterización de compuestos volátiles en “orégano compacto”.
 - 10.3.2.1- Comparación entre el análisis por HS-SPME y del aceite esencial.
 - 10.3.2.2- Diferencias entre la composición de inflorescencias y hojas.
 - 10.3.3- Caracterización de compuestos volátiles en “orégano criollo”.
 - 10.3.4- Caracterización de compuestos volátiles en “orégano chileno II”.
 - 10.4- Caracterización de compuestos volátiles en muestras comerciales de orégano.
 - 10.5- Análisis sensorial de las muestras orégano.
 - 10.6- Correlación entre datos químicos y sensoriales de las muestras de orégano comercial.
-

10.1- Introducción

El nombre orégano comprende más de dos docenas de diferentes especies de plantas, con flores y hojas que presentan un olor característico especiado (Arcila-Lozano *et al.*, 2004), siendo las hojas secas de *Origanum vulgare* (Lamiaceae) el de uso culinario más común (Barreyro *et al.*, 2005). El género *Origanum* incluye más de 70 especies, subespecies, variedades e híbridos (Torres *et al.*, 2012). Los principales productores de orégano son España, Grecia, Francia y Turquía, en Europa y Chile, México y Perú en América (Barreyro *et al.*, 2005). Los aceites esenciales de orégano se han utilizado como agentes aromatizantes en alimentos y bebidas, entre otros (Rehder *et al.*, 2004).

Los distintos tipos de orégano no sólo tienen importancia por su uso con fines culinarios, sino también por su variada actividad biológica, entre las que se encuentran su acción contra un amplio espectro de bacterias (Charai *et al.*, 1996; Aligiannis *et al.*, 2001; Abou-Jawdah *et al.*, 2002; Baydar *et al.*, 2004; Chorianopoulos *et al.*, 2004; Dorman & Deans, 2004; Şahin *et al.*,

2004; Busatta *et al.*, 2007; Busatta *et al.*, 2008; Joshi *et al.*, 2009; Upadhyay, 2010; Béjaoui *et al.*, 2013; De Falco *et al.*, 2013; Stojković *et al.*, 2013; Martins *et al.*, 2014; Moradi *et al.*, 2014), hongos (Charai *et al.*, 1996; Adam *et al.*, 1998; Aligiannis *et al.*, 2001; Şahin *et al.*, 2004; Carmo *et al.*, 2008; Kordali *et al.*, 2008; Upadhyay 2010; de Sousa *et al.*, 2013; Mancini *et al.*, 2014), parásitos (Santoro *et al.*, 2007; Cetin *et al.*, 2009), virus (Sökmen *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2014) e insectos (Kordali *et al.*, 2008; Govindarajan *et al.*, 2016). También se ha reportado su actividad antioxidante (Cervato *et al.*, 2000; Dorman & Deans, 2004; Kulisic *et al.*, 2004; Şahin *et al.*, 2004; Hazzit *et al.*, 2006; Hernández-Hernández *et al.*, 2009; Quiroga *et al.*, 2011; Asensio *et al.*, 2012; Teixeira *et al.*, 2013; Martins *et al.*, 2014), antimutagénica (Idaomar *et al.*, 2002; Ipek *et al.*, 2005; Mezzoug *et al.*, 2007), fitotóxica (Kordali *et al.*, 2008; Mancini *et al.*, 2014), contra el cáncer (Al-Kalaldeh *et al.*, 2010) e inhibidora de enzimas (Jukic *et al.*, 2007; Aazza *et al.*, 2011; Sarikurkcü *et al.*, 2015). Su acción antimicrobiana, antifúngica y antioxidante ha demostrado ser muy útil para la conservación y estabilidad de alimentos tales como aceites de oliva (Olmedo *et al.*, 2009; Asensio *et al.*, 2012, 2013), embutidos (Busatta *et al.*, 2007, 2008), uvas (de Sousa *et al.*, 2013), maní (Olmedo *et al.*, 2009), semillas de girasol (Quiroga *et al.*, 2015), queso (Olmedo *et al.*, 2013), carne picada (Skandamis & Nychas, 2001) y otros alimentos (Chorianopoulos *et al.*, 2004; Şahin *et al.*, 2004; Chi *et al.*, 2006; Souza *et al.*, 2007; Carmo *et al.*, 2008).

En medicina tradicional, distintos tipos de orégano se han utilizado como diaforéticos (Asensio *et al.*, 2013; De Falco *et al.*, 2013), antisépticos (Asensio *et al.*, 2013; De Falco *et al.*, 2013), antiespasmódicos (Asensio *et al.*, 2013; De Falco *et al.*, 2013), carminativos (De Falco *et al.*, 2013), analgésicos (De Falco *et al.*, 2013), usándose también en medicinas alternativas y homeopáticas de todo el mundo (Asensio *et al.*, 2013).

En Argentina, la mayor demanda de orégano ha estimulado el desarrollo de nuevas áreas de producción, generando importantes oportunidades comerciales para los pequeños productores agropecuarios (Asensio *et al.*, 2015). Las principales áreas de producción están ubicadas en las provincias de Mendoza, Córdoba y San Juan (Torres *et al.*, 2012), aunque existen áreas de producción más pequeñas en las regiones noroccidentales de las provincias de Salta y Jujuy (Fariás *et al.*, 2010). Comercialmente se producen varios tipos de orégano en Argentina, mencionándose, en diversos artículos científicos, siete entidades taxonómicas del género *Origanum* entre especies, subespecies e híbridos (Argüello *et al.*, 2012). Estas entidades son muy parecidas entre sí y bastante difíciles de identificar, ya que los caracteres más importantes que se tienen en cuenta son: ancho de la bráctea que acompaña a la flor, longitud y disposición de los pelos del carpostegio, y grado de hendidura del labio inferior del cáliz

(Argüello *et al.*, 2012). Por lo tanto, hasta tanto se llegue a una clasificación definitiva, las especies se identifican por su nombre vulgar (Argüello *et al.*, 2012) o de fantasía. En este sentido, para designar los diferentes especímenes, se utilizan nombres locales asignados por los mismos productores, que incluyen en esos nombres características fenotípicas del material o su lugar de origen (Torres *et al.*, 2012). Es más, diversos nombres de fantasía se dan a menudo especímenes que son genéticamente equivalentes (Torres *et al.*, 2012).

Los tipos de orégano cultivados más comúnmente en Argentina son los denominados *Compacto*, *Cordobés*, *Criollo* y *Mendocino* (Asensio *et al.*, 2015). Como se dijo anteriormente, no existe uniformidad en el tratamiento taxonómico de los diferentes tipos de orégano cultivados en el país. Por ejemplo, Torres *et al.* (2010), consideraron que el clon Mendocino correspondió al híbrido entre *O. vulgare* y *O. majorana* (*Origanum x majoricum* Camb.), clasificaron el tipo Compacto como *O. vulgare* subsp. *vulgare*, mientras que consideraron las variedades Criollo y Cordobés como subespecies de *O. vulgare* spp. *hirtum*. En cambio, para Barreyro *et al.* (2005), Criollo y Mendocino son dos ecotipos de un mismo híbrido entre *O. vulgare* y *O. majorana* (*O. x aplii* Domin). Rouquaud & Videla (2000) reportaron que Criollo, Mendocino y Compacto pertenecen a entidades diferentes: las dos primeras a los híbridos *O. x aplii*, y *O. x majoricum*, respectivamente, y el tercero a *O. vulgare* ssp. *virens*. Di Fabio (2005) consideró dentro del híbrido *O. x aplii* las variedades Criollo y Cordobés. Por su parte, Dambolena *et al.* (2010) consideraron como *O. x appli* la variedad Criollo, *O. vulgare vulgare* la variedad Compacto, *O. vulgare vulgare virens* la variedad Cordobés, y *O. x majoricum* la variedad Mendocino. Un estudio de cuatro oréganos comerciales argentinos realizado en las provincias del noreste indicó que se encontraron variedades correspondientes a los híbridos *Origanum x majoricum* y *O. vulgare* subsp. *viridulum* Nyman (Fariás *et al.*, 2010).

En la provincia de Córdoba, el Valle de Traslasierra posee un clima adecuado para la producción de hierbas medicinales y aromáticas (Argüello *et al.*, 2012). Dicho clima se caracteriza por una alta heliofanía (promedio anual 491 mJ/cm²), baja nubosidad, baja humedad relativa y una marcada amplitud térmica (promedio anual 12 °C) (Argüello *et al.*, 2012). Dentro del rubro aromáticas, el orégano es la especie de mayor relevancia en cuanto a superficie cultivada, rendimientos económicos e impacto social en la región (Argüello *et al.*, 2012). En este sentido, Córdoba ocupa el segundo lugar en importancia en superficie cultivada con orégano, luego de la provincia de Mendoza que representa aproximadamente el 85% de la superficie en Argentina (Argüello *et al.*, 2012). En la región de Córdoba, los principales ecotipos que se cultivan son el orégano Criollo (Figura 10.1a) y el Chileno II

(Figura 10.1b), no obstante, existen otras tasas promisorias que necesitan ser determinadas científicamente como es el caso de orégano Compacto (Figura 10.1c) (Lenardis *et al.*, 2006).



Figura 10.1. Tipos de orégano producidos en Córdoba, Argentina: (a) Orégano criollo. (b) Orégano chileno II. (c) Orégano compacto.¹

A pesar de su importancia económica, el orégano producido en Argentina a menudo es considerado de calidad inferior para su uso como especia, debido a que se cultiva sin tener en consideración la variedad, la salud y las prácticas de cosecha y poscosecha (Torres *et al.*, 2012), situación que hace difícil conservar el producto libre de contaminación (Torres *et al.*, 2012). Además del problema de identificación taxonómica de los especímenes cultivados, en nuestro país no existen cultivares y/o variedades de orégano registrados (Torres *et al.*, 2012). En este sentido, en un informe situacional de la producción de orégano, los productores del Valle de Translasierra (Córdoba, Argentina) manifestaron la necesidad de determinar la calidad del producto para poder llegar a establecer estándares y lograr la certificación para

¹ Fotos provistas por el Ing. Agr. Gustavo M. Ruiz, Herbario Marcelino Sayago, Universidad Católica de Córdoba.

competir en los mercados extranjeros (Arizio & Curioni, 2003; COFECYT, 2007), convirtiéndose así en un área-problema de importancia regional.

Por todo lo anterior, y debido a que la calidad sensorial de esta especia aromática está determinada por su sabor y olor, lo cual se relaciona, a su vez, con la composición de su fracción orgánica volátil, en este capítulo se describe la optimización de una técnica de HS-SPME para la caracterización de CVV en diferentes muestras de orégano comercial, el análisis de aceptabilidad sensorial de las mismas y el estudio de correlación de los datos químicos y sensoriales de las mismas muestras comerciales. Adicionalmente, se realiza la caracterización química y sensorial de los principales ecotipos cultivados en Córdoba, de modo que pueda aportar datos para el establecimiento de estándares de calidad de los mismos.

10.2- Optimización del muestreo por HS-SPME

10.2.1- Selección del tipo de fibra SPME

Las figuras 10.2 y 10.3 muestran el efecto del tipo de fibra sobre el área total de picos y sobre el área de los picos de algunos CVV de orégano comercial. El orden de eficiencia de extracción de volátiles determinado a partir del área total fue: DVB-CAR-PDMS > PDMS-DVB > PA > CAR-PDMS \geq PDMS, siendo la fibra DVB-CAR-PDMS la que mostró una capacidad de extracción aproximadamente un 40 % mayor que el resto de las fibras estudiadas. Cuando se realizó el análisis de varianza (ANOVA) con test de Tukey para las áreas totales (Tabla 10.1), hubo diferencias significativas entre todas las fibras excepto PDMS y CAR-PDMS, cuyas diferencias no fueron significativas ($p < 0,05$).

Todos los CVV de orégano comercial fueron mejor extraídos con la fibra DVB-CAR-PDMS, aunque es más notable en el caso de 4-terpineol (Figura 10.3). Estos resultados se debieron probablemente a que el recubrimiento de esta fibra contiene una combinación de materiales sorbentes líquidos (PDMS) y sólidos (DVB y CAR) en comparación con las otras fibras evaluadas, lo que conduce a una sorción equilibrada de compuestos volátiles y semivolátiles (Bianchin *et al.*, 2012). Esto también se ha demostrado en una amplia gama de analitos volátiles y semivolátiles a partir de muestras diferentes (Rey-Salgueiro *et al.*, 2009; Bogusz *et al.*, 2011; Bianchin *et al.*, 2012; Merkle *et al.*, 2015; Corpas *et al.*, 2016).

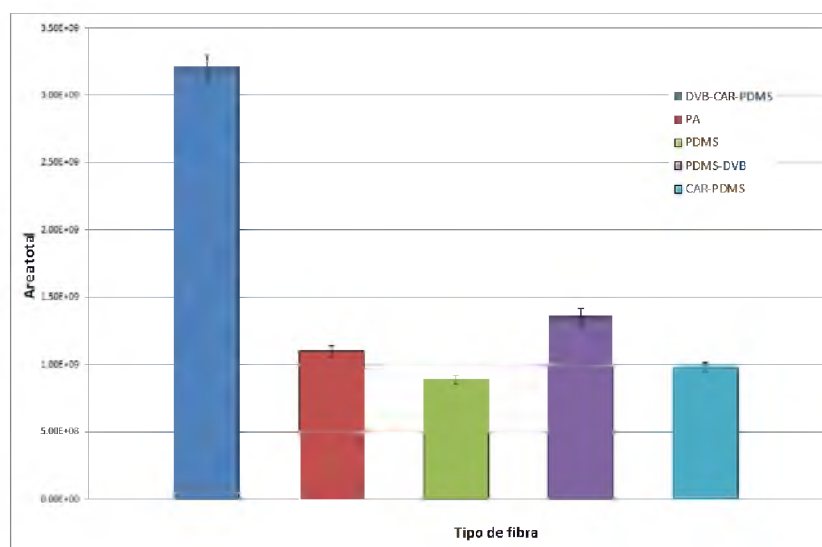


Figura 10.2. Efecto del tipo de fibra sobre el proceso de microextracción de componentes volátiles totales de orégano comercial.

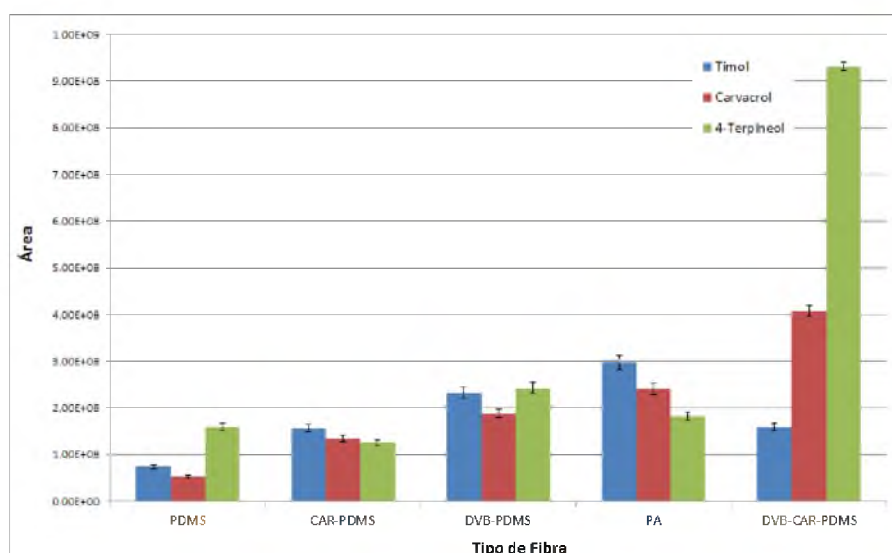


Figura 10.3. Efecto del tipo de fibra sobre el área de los picos mayoritarios de orégano.

Por todo lo anterior, se seleccionó la fibra DVB-CAR-PDMS para los análisis sucesivos.

10.2.2- Selección de la temperatura de trabajo

Las figuras 10.4, 10.5 y 10.6 muestran el efecto de la temperatura de microextracción sobre el área total de picos y sobre el área de algunos CVV de orégano comercial. El aumento de temperatura incrementa el área total de picos. Sin embargo, la temperatura de extracción afecta de manera diferente a cada CVV: en el caso de timol y de la mayoría de los

componentes minoritarios, el área siempre aumenta con la temperatura; el área de carvacrol aumenta hasta los 80 °C y posteriormente disminuye; el área del 4-terpineol aumenta hasta los 50 °C, temperatura a partir de la cual comienza a disminuir; el área de γ -terpineno se mantiene aproximadamente constante hasta 40 °C, luego disminuye hasta los 70 °C, temperatura a partir de la cual aumenta bruscamente; el área de *p*-cimeno disminuye con la temperatura hasta los 70 °C, donde aumenta levemente; el área de timil metil éter se mantiene relativamente constante y a partir de los 70 °C empieza a aumentar; finalmente, en el caso de α -terpineol, su área aumenta hasta los 70 °C y luego comienza a disminuir.

Cuando se realizó un ANOVA sobre las áreas totales obtenidas a las distintas temperaturas, no se observaron diferencias significativas entre las temperaturas 40, 50 y 70 °C, pero si entre ellas y las demás temperaturas estudiadas (Tabla 10.1). En este estudio se observó que, hasta los 40 °C las áreas de todos los CVV aumentan con el incremento de dicha variable o se mantienen relativamente constantes, a temperaturas mayores, las cantidades de algunos CVV aumentan y otros disminuyen. Estas diferencias pueden estar relacionadas con el efecto de la temperatura sobre sus coeficientes de distribución entre el HS y la fibra, que, como se vio en el Capítulo 3, hay casos en los que aumentan y otros en los que disminuyen con la temperatura (Wercinski, 1999; Pawliszyn, 2012). Resultados similares se obtuvieron en la optimización de la técnica HS-SPME para la determinación de CVV de diversos tipos de muestras (Hamm *et al.*, 2003; Ma *et al.*, 2013; Vandendriessche *et al.*, 2013; Bianchin *et al.*, 2014).

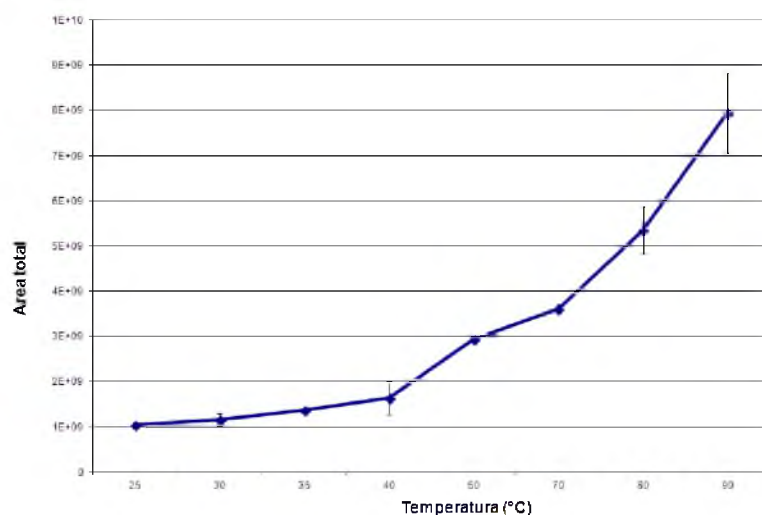


Figura 10.4. Efecto de la temperatura sobre la microextracción sobre el área total de picos del cromatograma de orégano comercial.

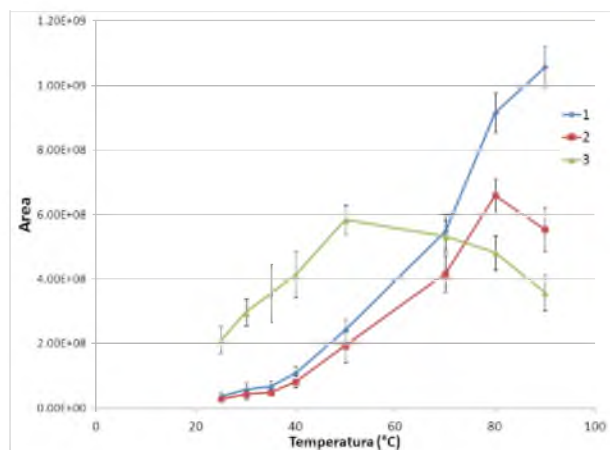


Figura 10.5. Efecto de la temperatura de extracción sobre las áreas de los componentes mayoritarios del orégano comercial. (1) Timol; (2) carvacrol; (3) 4-terpineol.

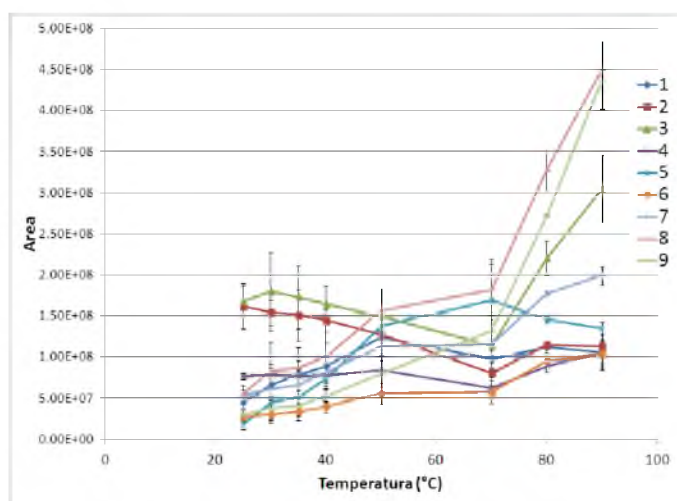


Figura 10.6. Efecto de la temperatura de extracción sobre las áreas de los componentes minoritarios del orégano comercial. (1) Linalool; (2) p-cimeno; (3) γ-terpineno, (4) β-felandreno; (5) α-terpineol; (6) timil metil éter; (7) carvacrol metil éter; (8) linalil acetato y (9) β-cariofileno.

A partir de los resultados, y debido a que no hubo diferencias significativas en el área total entre 40 y 70 °C (Tabla 10.1), se seleccionó la temperatura de 40 °C como la mínima temperatura de trabajo capaz de lograr una buena microextracción de CVV (Wercinski, 1999; Pawliszyn, 2012).

10.2.3- Selección del tiempo de equilibrado del HS y de exposición de la fibra

La figura 10.7 muestra el efecto del tiempo de equilibrado del HS y de exposición de la fibra sobre el área total de picos de los cromatogramas de orégano comercial. El incremento en el

tiempo de equilibrio del HS no afecta significativamente al proceso de SPME, mientras que si lo hace el tiempo de exposición de la fibra, siendo ésta significativamente mayor a los 60 minutos de exposición (Tabla 10.1). Resultados similares se obtuvieron en otros estudios de optimización, con tiempos óptimos de 10 min de equilibrado del HS o incluso menores (Ma *et al.*, 2013; Vandendriessche *et al.*, 2013).

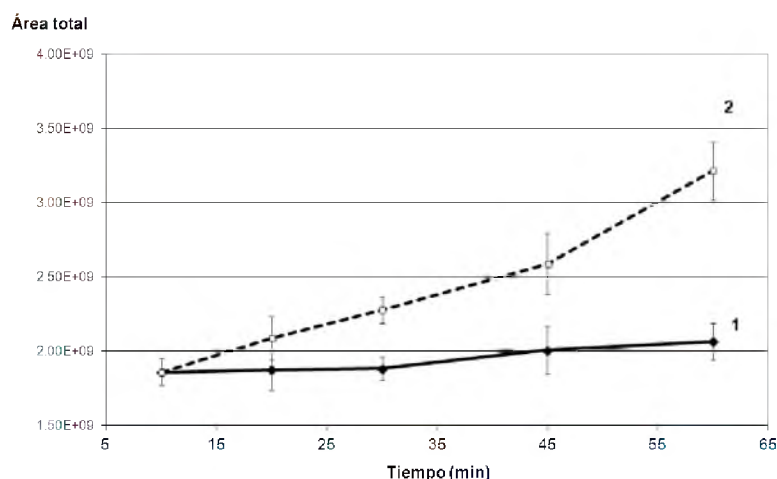


Figura 10.7. Efecto del tiempo de equilibrado del HS y de exposición de la fibra sobre la microextracción de componentes volátiles de orégano comercial. (1) Efecto del tiempo de equilibrio del HS. (2) Efecto del tiempo de exposición de la fibra.

Tabla 10.1. Optimización de las condiciones experimentales para el análisis de orégano.

Variable	Categoría	Área total	SD ¹	Test Tukey ²
Tipo de fibra	PDMS	8,88E+08	3,2E+07	A
	CAR-PDMS	9,79E+08	4,1E+07	A, B
	PA	1,10E+09	4,0E+07	B
	PDMS-DVB	1,36E+09	6,0E+07	C
	DVB-CAR-PDMS	3,21E+09	9,0E+07	D
Temperatura (°C)	25	1,03E+09	6,0E+07	A
	30	1,15E+09	1,3E+08	A
	40	2,04E+09	3,7E+08	A, B
	50	2,93E+09	6,9E+07	B
	70	3,60E+09	1,1E+08	B
	80	5,35E+09	5,1E+08	C
	90	7,94E+09	8,9E+08	D
Tiempo de equilibrado del HS (min)	10	1,70E+09	1,8E+08	A
	20	1,84E+09	1,2E+08	A
	30	1,77E+09	1,3E+08	A
	45	1,97E+09	2,0E+08	A
	60	1,87E+09	1,5E+08	A
Tiempo de exposición de la fibra (min)	10	1,70E+09	1,8E+08	A
	20	2,38E+09	1,8E+08	B
	30	2,45E+09	1,6E+08	B
	45	2,69E+09	9,7E+07	B
	60	3,16E+09	7,5E+07	C

¹ Desviación estándar de determinaciones por triplicado.

² Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

A partir de los resultados de optimización, las condiciones adoptadas para el análisis de orégano fueron: fibra extractante: DVB-CAR-PDMS; temperatura de extracción: 40 °C; 10 minutos de equilibrio del HS y 60 minutos de exposición de la fibra en el HS.

10.3- Caracterización de compuestos volátiles en diferentes tipos de orégano cultivado en Córdoba, Argentina

La tabla 10.2 muestra los resultados obtenidos del análisis de CVV de las muestras provenientes del campo experimental de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Nacional de Córdoba, correspondientes a hojas e inflorescencias de *Origanum x majoricum* Cambessedes y de Orégano compacto, y de las muestras provistas por la Cooperativa AROMET (Valle de Traslasierra), correspondientes a hojas desecadas de orégano denominados “Orégano criollo” y “Orégano chileno II”. Todas las determinaciones se llevaron a cabo mediante la técnica de HS-SPME optimizada y por análisis del aceite esencial. La figura 10.8 muestra las estructuras químicas de algunos CVV hallados en las muestras analizadas.

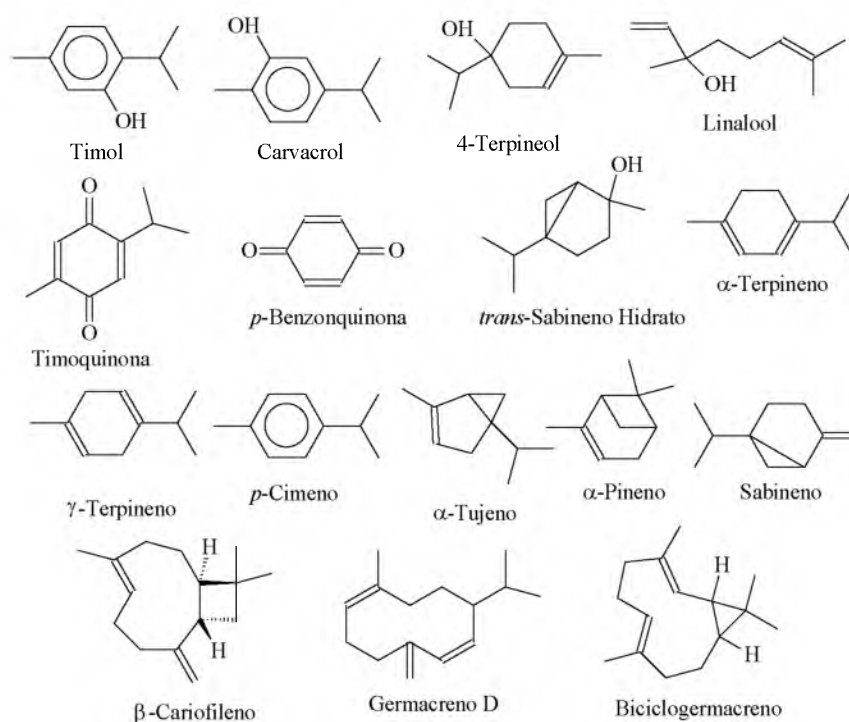


Figura 10.8. Algunos componentes volátiles hallados en las muestras de los tipos de orégano producido en Córdoba, Argentina. ²

² Fuente de las estructuras químicas: Base de datos NIST: <http://webbook.nist.gov/chemistry/>

Tabla 10.2. Componentes volátiles hallados en muestras de orégano cultivado en Córdoba, Argentina, por análisis del aceite esencial y por HS-SPME, usando una fibra DVB-CAR-PDMS 50/30 µm; temperatura de extracción de 40 °C; 10 minutos de equilibrio del HS y 60 minutos de exposición de la fibra en el HS. Se muestran valores promedios de tres determinaciones, cuyos CV fueron menores al 5 %.

Pico	tr ^a	Compuesto ^b	% ^c												KI ^e Exp	KI ^e Lit
			<i>Origanum x majoricum</i> (UNC)				O. compacto (UNC)				O. criollo AROMET		O. chileno II AROMET			
			HS-SPME				HS-SPME				HS- SPME		HS- SPME			
			H	I	P.E.	A.E.	H	I	P.E.	A.E.	SPME	A.E.	SPME	A.E.		
1	4,47	2-hexenal	1,2	0,2	0,9	ND ^a	2,9	0,8	0,3	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	885	874
2	6,08	<i>p</i> -benzoquinona	5,1	ND	2,9	ND	5,9	ND	1,3	ND	ND	ND	ND	ND	910	912
3	6,35	α-tujeno	0,3	0,4	0,3	0,3	0,2	0,2	1,9	0,2	6,8	1,2	6,1	1,1	927	930
4	6,58	α-pineno	0,2	0,1	0,2	0,2	ND	0,1	0,2	0,4	7,2	0,9	ND	0,9	950	948
5	7,49	benzaldehído	0,9	ND	0,2	ND	0,6	0,2	0,2	0,2	ND	ND	ND	ND	960	961
6	7,94	sabineno	0,9	0,7	0,9	0,3	1,0	1,2	3,9	0,2	0,3	1,9	6,8	2,0	964	964
7	8,11	1-octen-3-ol	1,7	0,3	0,9	0,3	1,9	0,9	1,7	0,9	0,4	0,3	0,5	0,2	992	991
8	8,42	octan-3-ona	0,2	ND	ND	ND	0,2	0,2	0,2	ND	ND	ND	ND	ND	997	994
9	8,58	β-mirceno*	0,5	0,3	0,4	1,2	0,9	0,9	1,1	1,5	0,6	1,1	0,8	1,0	1000	998
10	9,17	α-felandreno	ND	ND	ND	1,0	ND	ND	0,1	2,8	1,1	0,9	1,1	0,6	1011	1013
11	9,67	α-terpineno	0,2	0,3	0,2	5,1	0,3	0,3	0,9	10,0	5,2	5,5	5,3	4,1	1024	1021
12	10,06	<i>p</i> -cimeno	18,4	3,2	7,8	12,1	19,9	2,3	6,0	12,0	1,3	4,9	1,8	4,2	1028	1025
13	10,21	β-felandreno	0,4	0,3	0,3	1,8	0,9	1,0	1,5	3,9	3,9	2,9	4,9	2,9	1036	1036
14	10,64	<i>cis</i> -β-ocimeno	1,3	0,2	0,9	1,9	2,9	0,9	0,8	2,1	0,6	1,0	1,1	0,4	1044	1041
15	11,10	<i>trans</i> -β-ocimeno	ND	ND	0,2	0,4	0,4	ND	0,3	0,3	0,5	0,2	0,6	0,2	1053	1056
16	11,65	γ-terpineno	1,0	1,8	1,4	1,8	2,8	0,9	1,9	0,9	8,9	12,3	8,2	10,2	1066	1066
17	12,10	<i>cis</i> -sabineno hidrato	2,9	1,9	1,8	1,6	2,1	2,8	3,2	ND	0,4	1,0	1,2	0,6	1070	1070
18	13,21	α-terpinoleno	ND	ND	ND	2,1	ND	ND	0,3	2,9	2,1	2,0	2,1	1,3	1087	1089
19	13,81	<i>trans</i> -sabineno hidrato	20,6	19,9	18,2	15,9	17,3	27,9	26,1	20,2	2,6	3,9	4,8	2,8	1099	1097
20	13,88	linalool*	ND	ND	ND	10,8	ND	ND	ND	ND	0,2	0,4	ND	ND	1104	1103
21	14,53	1-octen-3-ol acetato	ND	ND	ND	ND	ND	0,8	1,1	ND	ND	ND	0,8	ND	1109	1110
22	15,36	p-ment-2-en-1-ol	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0,1	0,6	0,1	ND	1119	1119
23	17,41	<i>allo</i> -ocimeno	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0,2	0,2	0,2	0,2	1130	1131
24	17,47	1-terpineol	ND	ND	ND	0,5	ND	ND	ND	ND	0,1	0,3	ND	ND	1136	1135
25	17,56	borneol	1,4	0,4	0,8	0,9	0,9	1,4	1,3	1,5	1,0	1,0	1,2	0,5	1168	1170
26	18,29	terpinen-4-ol (4-terpineol)	2,8	0,4	0,9	8,9	1,8	0,9	1,4	13,5	2,0	13,9	2,6	13,1	1180	1178
27	18,61	alcohol β-fenchílico	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	1,9	ND	1185	1179
28	19,13	α-terpineol	3,0	3,4	2,8	1,9	1,9	2,9	2,8	2,8	2,8	1,5	2,8	1,4	1188	1190
29	19,32	estragol	2,2	ND	0,5	4,8	ND	ND	ND	ND	2,8	2,0	ND	ND	1195	1199

Tabla 10.2. Continuación.

Pico	tr ^a	Compuesto ^b	% ^c												KT ^e Exp	KT ^f Lit
			<i>Origanum x majoricum</i> (UNC)				O. compacto (UNC)				O. criollo AROMET		O. chileno II AROMET			
			HS-SPME				HS-SPME				HS- SPM		HS- SPM			
			H	I	P.E.	A.E.	H	I	P.E.	A.E.	E	A.E.	E	A.E.		
30	19,46	<i>cis</i> -dihidrocarvona	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	0,2 ^b	0,1 ^b	ND ^a	ND ^a	ND ^a	0,1 ^b	2,7 ^c	1203	1200
31	21,50	<i>trans</i> -dihidrocarvona	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	0,1 ^b	ND ^a	1212	1213
32	21,89	timil metil eter	0,2 ^b	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	0,2 ^b	0,3 ^b	0,4 ^b	0,1 ^b	ND ^a	0,2 ^b	ND ^a	1225	1229
33	22,47	carvacrol metil eter	4,2 ^d	1,9 ^b	2,1 ^b	1,0 ^a	3,2 ^c	3,1 ^c	3,8 ^d	1,9 ^b	2,2 ^b	1,1 ^a	2,4 ^b	1,0	1236	1239
34	22,86	timoquinona	4,7 ^e	2,9 ^d	5,7 ^f	0,8 ^c	4,4 ^e	0,9 ^c	0,9 ^c	ND ^a	0,1 ^b	ND ^a	0,3 ^b	ND ^a	1242	1244
35	23,52	carvona	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	0,7 ^c	ND ^a	0,2 ^b	ND ^a	1245	1246
36	23,31	linalil acetato	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	3,9 ^b	3,3 ^b	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	1248	1248
37	25,75	timol*	16,2 ^c	33,6 ⁱ	29,3 ^h	20,9 ^d	13,5 ^a	20,0 ^d	14,6 ^b	20,2 ^d	23,0 ^f	27,3 ^g	22,1 ^e	35,1 ^j	1297	1292
38	26,27	carvacrol*	1,5 ^b	5,0 ^d	4,8 ^d	1,8 ^b	0,9 ^b	0,2 ^a	0,2 ^a	1,2 ^b	4,1 ^c	4,3 ^c	3,9 ^c	6,8 ^e	1302	1300
39	28,07	bicicloelemeno	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	0,2 ^b	ND ^a	0,6 ^c	ND ^a	1328	1334
40	28,41	α -cubebeno	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	0,2 ^b	ND ^a	0,2 ^b	ND ^a	1343	1347
41	30,04	α -ylangeno	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	0,2 ^b	ND ^a	0,1 ^b	ND ^a	1362	1364
42	30,16	α -copaeno	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	0,3 ^b	ND ^a	0,1 ^b	ND ^a	1369	1372
43	30,27	neril acetato	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	0,1 ^b	ND ^a	0,2 ^b	ND ^a	1372	1375
44	31,32	β -bourboneno	0,3 ^b	ND ^a	0,1 ^b	ND ^a	0,7 ^c	ND ^a	0,2 ^b	ND ^a	0,2 ^b	ND ^a	0,3 ^b	ND ^a	1381	1384
45	26,59	β -elemeno	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	0,1 ^b	ND ^a	0,1 ^b	ND ^a	1383	1388
46	26,69	geranil acetato	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	0,2 ^b	ND ^a	0,3 ^b	ND ^a	1385	1386
47	33,48	β -cariofileno*	2,8 ^c	7,9 ^f	4,9 ^d	1,0 ^b	5,1 ^d	9,5 ^g	8,1 ^f	ND ^a	5,9 ^e	2,9 ^c	4,9 ^d	2,6 ^c	1418	1415
48	30,64	β -gurjureno	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	0,6 ^b	ND ^a	0,5 ^b	ND ^a	1420	1421
49	30,82	γ -elemeno	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	0,2 ^b	ND ^a	0,2 ^b	ND ^a	1426	1431
50	30,93	aromadendreno	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	0,8 ^c	0,2 ^b	0,6 ^c	ND ^a	1431	1439
51	31,03	aristoleno	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	0,6 ^b	ND ^a	0,5 ^b	ND ^a	1334	1429
52	35,21	geranil acetona	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	0,2 ^b	ND ^a	0,1 ^b	ND ^a	1441	1443
53	35,60	α -humuleno	0,2 ^b	0,5 ^{b,c}	0,3 ^b	ND ^a	0,6 ^{b,c}	0,4 ^b	0,3 ^b	ND ^a	0,5 ^{b,c}	0,2 ^b	0,7 ^c	0,2 ^b	1448	1452
54	36,54	α -elemeno	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	0,4 ^b	ND ^a	0,5 ^b	ND ^a	1453	1454
55	36,82	<i>allo</i> -aromadendreno	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	0,1 ^b	ND ^a	ND ^a	ND ^a	1473	1480
56	36,96	α -amorfenoleno	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	0,6 ^b	0,4 ^b	0,4 ^b	0,4 ^b	1469	1465
57	37,34	germacreno D	1,2 ^b	8,8 ^f	4,8 ^e	ND ^a	3,6 ^d	5,1 ^e	2,9 ^c	ND ^a	1,3 ^b	0,9 ^b	1,1 ^b	0,9 ^b	1476	1480
58	37,46	valenceno	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	2,0 ^b	ND ^a	1,7 ^b	ND ^a	1488	1490
59	37,52	α -muuroleno	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	1,1 ^b	1,1 ^b	0,7 ^b	0,9 ^b	1490	1495
60	38,32	biciclogermacreno	1,0 ^c	3,8 ^f	3,3 ^e	ND ^a	3,1 ^e	5,6 ^g	2,9 ^d	ND ^a	0,2 ^b	0,4 ^b	0,5 ^b	0,3 ^b	1495	1495
61	39,16	β -bisaboleno	ND ^a	ND ^a	0,6 ^{b,c}	ND ^a	ND ^a	4,1 ^e	3,1 ^d	ND ^a	0,9 ^c	0,2 ^b	ND ^a	ND ^a	1503	1506

Tabla 10.2. Continuación.

Pico	t _R ^a	Compuesto ^b	% ^c												K _T ^e Exp	K _T ^e Lit
			<i>Origanum x majoricum</i> (UNC)				O. compacto (UNC)				O. criollo AROMET		O. chileno II AROMET			
			HS-SPME		A.E		HS-SPME		A.E.		HS- SPME	A.E.	HS- SPME	A.E.		
			H	I	P.E.	.	H	I	P.E.	A.E.	SPME	A.E.	SPME	A.E.		
62	39,44	γ-cadineno	0,3 ^b	0,9 ^c	0,1 ^b	0,4	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	1,2 ^c	0,4 ^b	0,9 ^c	0,2 ^b	1510	1512
63	40,07	δ-cadineno	ND ^a	0,2 ^b	0,2 ^b	0,4 ^b	ND ^a	ND ^a	0,3 ^b	ND ^a	0,2 ^b	0,2 ^b	0,2 ^b	0,3 ^b	1520	1522
64	40,45	cadina-1,4-dieno	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	0,2 ^b	ND ^a	0,1 ^b	ND ^a	1527	1532
65	43,19	óxido de cariofileno	0,9 ^c	0,3 ^b	0,9 ^c	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	0,1 ^b	ND ^a	ND ^a	ND ^a	1582	1578
66	43,49	spatulanol	1,5 ^d	0,2 ^b	0,5 ^{b,c}	ND ^a	ND ^a	ND ^a	0,2 ^b	ND ^a	0,1 ^b	0,7 ^c	0,2 ^b	0,8 ^c	1607	1605

^a Tiempo de retención; ^b Identificados por GC-MS; ^c Cuantificados por GC-FID, letras distintas indican diferencias significativas del ANOVA con test Tukey (p<0,05); ^d Índices de retención de Kovat's experimentales; ^e Índices de retención de Kovat's de literatura; H: Hojas; I: Inflorescencias; P.E.: Hojas e inflorescencias juntas; A.E.: Aceite Esencial; ND: Compuesto No Detectado; * Compuestos identificados también por comparación con estándares de Sigma-Aldrich.

10.3.1- *Caracterización de compuestos volátiles en Origanum x majoricum Cambessedes*

10.3.1.1- Comparación entre el análisis por HS-SPME y del aceite esencial

A partir del análisis del AE de *Origanum x majoricum*, se hallaron 28 CVV diferentes, los cuales fueron identificados en su totalidad, mientras que por HS-SPME se encontraron 34, también identificados en su totalidad. Esta situación representa la caracterización de alrededor de un 18 % más de CVV mediante el análisis por HS-SPME (Tabla 10.2). Timol fue el componente principal en ambas técnicas, aunque en cantidades diferentes.

Comparando los resultados del análisis del AE y por HS-SPME, algunas similitudes y diferencias destacables fueron:

- (a) Algunos de los componentes identificados en el AE no se encontraron por HS-SPME y viceversa. Los componentes que se encontraron en el AE, aunque no por HS-SPME fueron α -felandreno, α -terpinoleno, linalool y 1-terpineol, mientras que los que se hallaron por HS-SPME, aunque no en el AE fueron 2-hexenal, *p*-benzoquinona, benzaldehído, β -bourboneno, α -humuleno, germacreno D, biciclogermacreno, β -bisaboleno, óxido de cariofileno y spatulenol.
- (b) Se observaron diferencias en las cantidades de algunos componentes entre HS-SPME y el análisis del AE. Los componentes que mayores diferencias en sus porcentajes mostraron fueron α -terpineno, *p*-cimeno, β -felandreno, terpinen-4-ol, estragol, timoquinona, carvacrol y β -cariofileno.

Es importante destacar las diferencias en las cantidades de 4-terpineol, α -terpineno y *p*-cimeno encontradas entre ambas técnicas, siendo notablemente mayor en el AE que por HS-SPME, y las de *cis* y *trans*-sabineno hidrato, las cuales fueron significativamente mayor por HS-SPME que en AE (Figura 10.9). Estas diferencias podrían explicarse en base a reportes de la literatura donde, contenidos de terpinen-4-ol, α -terpineno, *p*-cimeno y γ -terpineno más altos hallados en el AE de especies de *O. majorana*, se debieron a reordenamientos durante el proceso de destilación a partir de sabineno, *cis* y *trans*-sabineno hidrato y sabineno (Figura 10.10) (Fischer *et al.*, 1987, 1988; Novak *et al.*, 2000), aunque en este caso las diferencias en las concentraciones de sabineno y γ -terpineno no fueron significativas.

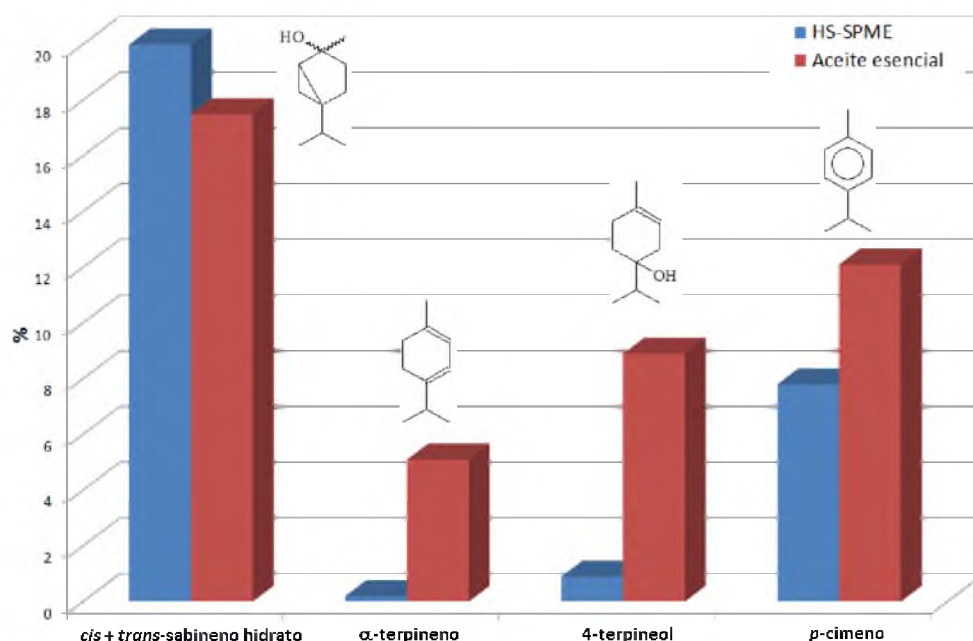


Figura 10.9. Distribución de terpenos oxigenados en *Origanum x majoricum* obtenidos por HS-SPME y en el aceite esencial.

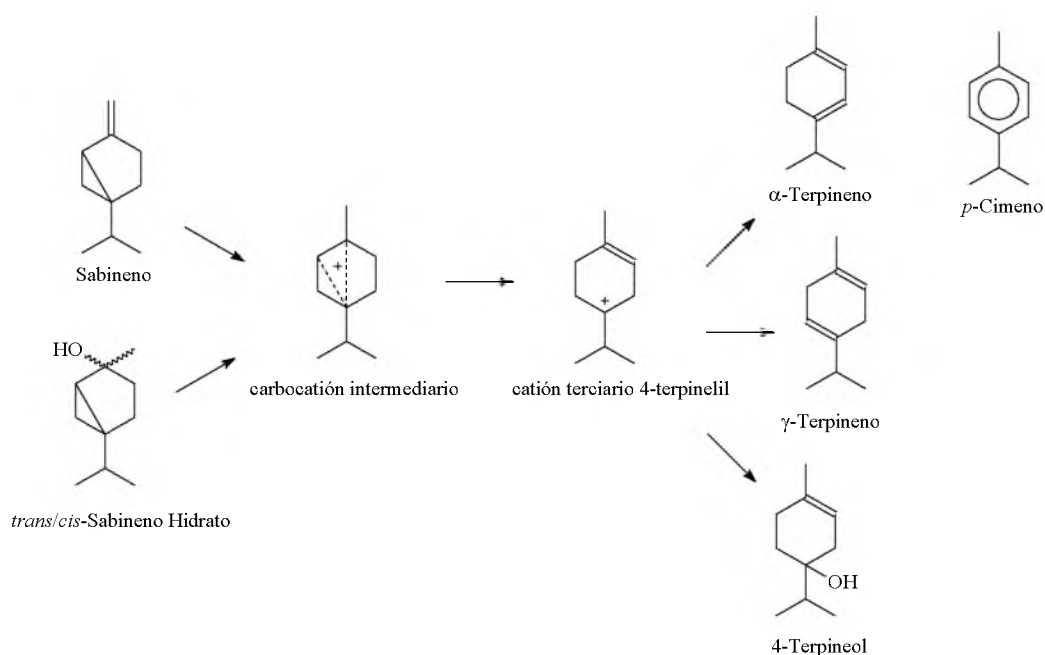


Figura 10.10. Esquema propuesto por Fisher *et al.* (1987, 1988) para las secuencias de reacciones que conducen al reordenamiento de *trans* y *cis*-sabineno hidrato para formar 4-terpineol, α-terpineno y p-cimeno durante la hidrodestilación de *O. majorana*.

La composición del AE de *Origanum x majoricum* de argentina ha sido investigada por otros investigadores, que, en diferentes cantidades, encontraron *trans*-sabineno hidrato y timol como componentes principales (Banchio *et al.*, 2009; Dambolena *et al.*, 2009; Quiroga *et al.*, 2011; Asensio *et al.*, 2015), lo que difiere de lo reportado en muestras del mismo híbrido originario de España, cuyo AE contenía como CVV principales terpinen-4-ol (19,8-20,7 %),

γ -terpineno (13,0-15,1 %), timol (0,8-14,1 %) y *cis*-sabineno hidrato (7,4-11,6 %), siendo la composición de timol muy variable en las muestras españolas (Babeluk 2013). También hay algunas diferencias en los reportes sobre la composición de CVV menores de *Origanum x majoricum* (Banchio *et al.*, 2009; Dambolena *et al.*, 2009; Quiroga *et al.*, 2011; Babeluk 2013; Asensio *et al.*, 2015). Estas diferencias pueden deberse a los factores que afectan significativamente la composición de volátiles tales como cambios en las condiciones ambientales durante el cultivo, las prácticas agrícolas y el estadio de desarrollo, como se ha demostrado en estudios de diversos tipos de orégano (D'Antuono *et al.*, 2000; Banchio *et al.*, 2009; Economou *et al.*, 2011; Baranauskienė *et al.*, 2013; Béjaoui *et al.*, 2013; Gong *et al.*, 2014; Lukas *et al.*, 2015). La concentración de 4-terpineol fue elevada en todos los reportes, siendo el encontrado en el AE similar al reportado por Asensio *et al.* (2015). En el caso de α -terpineno, Dambolena *et al.*, (2010) reportan cantidades similares a las encontradas en el AE, mientras que no se encontró en las muestras informadas por Asensio *et al.* (2015).

No se encontraron reportes de análisis de CVV de *Origanum x majoricum* por HS-SPME.

10.3.1.2- Diferencias entre la composición de inflorescencias y hojas

Timol y *trans*-sabineno hidrato fueron los principales componentes en las inflorescencias frescas, mientras que en las hojas lo fueron *trans*-sabineno hidrato, *p*-cimeno y timol.

Comparando los resultados obtenidos en las inflorescencias y hojas de *Origanum x majoricum*, algunas de las similitudes y diferencias más importantes fueron:

- (a) Las diferencias entre el número de compuestos hallados en cada parte de la planta no fueron muy importantes, aunque se encontraron más CVV en hojas que en inflorescencias (33 y 28 CVV respectivamente).
- (b) Las concentraciones de varios componentes fueron diferentes en las partes aéreas estudiadas, siendo las diferencias más significativas en las cantidades de *p*-cimeno, *cis*- β -ocimeno, borneol, terpinen-4-ol, carvacrol metil éter, timol, carvacrol, β -cariofileno, germacreno D, biciclogermacreno y spatulenol.
- (c) Se hallaron componentes distintivos en hojas e inflorescencias. En el caso de las hojas fueron *p*-benzoquinona, benzaldehído, octan-3-ona, estragol, timil metil éter, β -bourboneno, mientras que en las inflorescencias fue δ -cadineno.

No se encontraron reportes de la composición de hojas e inflorescencias por separado en *Origanum x majoricum*.

10.3.2- *Caracterización de compuestos volátiles en “orégano compacto”*

10.3.2.1- Comparación entre el análisis por HS-SPME y del aceite esencial

A partir del análisis del AE de “orégano compacto”, se hallaron 22 CVV diferentes, los cuales fueron identificados en su totalidad, mientras que por HS-SPME se encontraron 38, también identificados en su totalidad. Esta situación representa la caracterización de alrededor de un 47 % más de CVV mediante el análisis por HS-SPME (Tabla 10.2).

Trans-sabineno hidrato y timol fueron los componentes principales tanto en el AE como por HS-SPME, aunque en el caso de *trans*-sabineno hidrato se hallaron concentraciones diferentes.

Comparando los resultados del análisis del AE y por HS-SPME, algunas similitudes y diferencias destacables fueron:

(a) Todos los componentes que se encontraron en el aceite esencial se observaron también por HS-SPME. Sin embargo, varios de los componentes hallados por HS-SPME no se encontraron en el AE: 2-hexenal, *p*-benzoquinona, octan-3-ona, *cis*-sabineno hidrato, 1-octen-3-ol acetato, *cis*-dihidrocarvona, timoquinona, linalil acetato, β -bourboneno, β -cariofileno, α -humuleno, germacreno D, biciclogermacreno, β -bisaboleno, δ -cadineno y spatulenol.

(b) Se observaron diferencias en las cantidades de algunos componentes entre HS-SPME y el análisis del AE, siendo los que mayores diferencias mostraron, α -tujeno, sabineno, α -felandreno, α -terpineno, *p*-cimeno, β -felandreno, *cis*- β -ocimeno, γ -terpineno, *trans*-sabineno hidrato, terpinen-4-ol, carvacrol metil éter, timol y carvacrol.

En este caso, del mismo modo que en *Origanum x majoricum*, las diferencias en las cantidades de 4-terpineol, α -terpineno, *p*-cimeno y γ -terpineno halladas entre ambas técnicas (Figura 10.11), siendo notablemente mayor en el AE que por HS-SPME (Figura 10.9), y las de sabineno, *cis* y *trans*-sabineno hidrato, notablemente mayores por HS-SPME que en el AE, se pueden explicar por las transformaciones propuestas por Fisher *et al* (1987, 1988) (Figura

10.10), aunque en este caso las diferencias de concentración de γ -terpineno no fueron significativas.

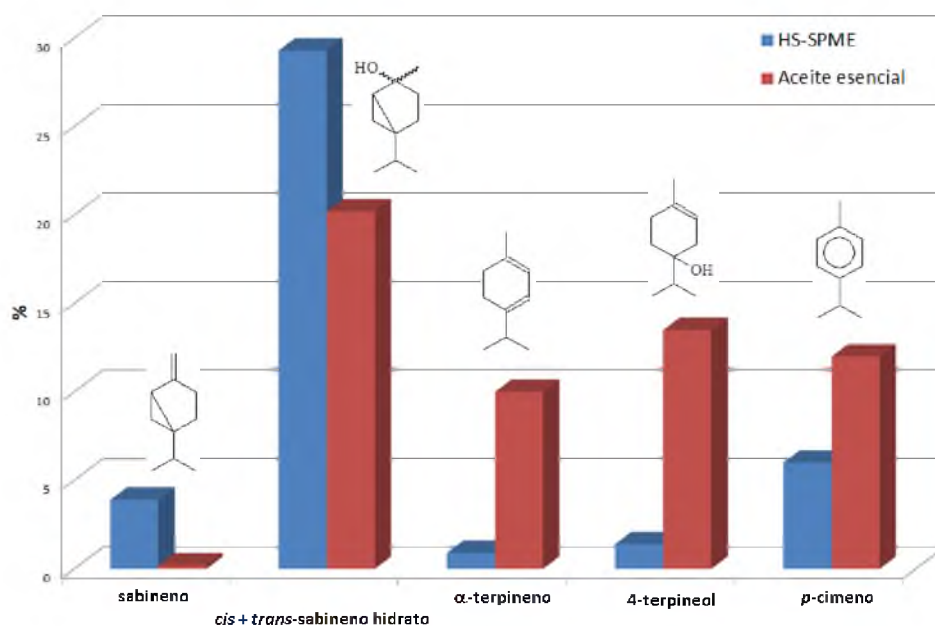


Figura 10.11. Distribución de terpenos oxigenados en orégano compacto obtenidos por HS-SPME y en el aceite esencial.

Otros investigadores reportaron la composición del AE de orégano compacto de diversas regiones de argentina (Dambolena *et al.*, 2010; Quiroga *et al.*, 2011; Asensio *et al.*, 2015), quienes también encontraron *trans*-sabineno hidrato y timol como componentes mayoritarios, aunque en concentraciones diferentes en las diferentes regiones. En este estudio se hallaron cantidades menores de *trans*-sabineno hidrato que las reportadas por Dambolena *et al.* (2010) (32,47 %), aunque similares a las reportadas por Quiroga *et al.* (2011) (27 %) y Asensio *et al.* (2015) (23,4-25,7 %). La cantidad de timol fue menor que la reportada por Quiroga *et al.* (2011) (26,6 %), aunque similar a las informadas por Dambolena *et al.* (2010) (20,5 %) y Asensio *et al.* (2015) (14,4-17,2 %). La composición reportada en la literatura de los demás CVV de orégano compacto fue muy variable (Dambolena *et al.*, 2010; Quiroga *et al.*, 2011; Asensio *et al.*, 2015).

10.3.2.2- Diferencias entre la composición de inflorescencias y hojas

Trans-sabineno hidrato y timol y fueron los principales componentes en las inflorescencias frescas, mientras que en las hojas lo fueron *p*-cimeno, *trans*-sabineno hidrato y timol.

Comparando los resultados obtenidos en las inflorescencias y hojas de “orégano compacto”, algunas de las similitudes y diferencias más importantes fueron:

- (a) Las diferencias entre el número de compuestos hallados en cada parte de la planta no fueron muy importantes, aunque se encontraron más CVV en hojas que en inflorescencias (31 y 28 CVV respectivamente).
- (b) Las concentraciones de varios componentes fueron diferentes en las distintas partes estudiadas, siendo las diferencias más importantes los porcentajes de 2-hexenal, *p*-cimeno, *cis*- β -ocimeno, γ -terpineno, *trans*-sabineno hidrato, timoquinona, timol, β -cariofileno y biciclogermacreno.
- (c) Se hallaron componentes distintivos en hojas e inflorescencias. En el caso de las hojas fueron *p*-benzoquinona y *trans*- β -ocimeno, mientras que en las inflorescencias fueron más numerosos: α -pineno, 1-octen-3-ol acetato, *cis*-dihidrocarvona, timil metil éter, linalil acetato y β -bisabolenol.

No se encontraron reportes de la composición de hojas e inflorescencias por separado en “orégano compacto”.

10.3.3- *Caracterización de compuestos volátiles en “orégano criollo”*

A partir del análisis del AE de orégano criollo, se hallaron 37 CVV diferentes, los cuales fueron identificados en su totalidad, mientras que por HS-SPME se encontraron 57, también identificados en su totalidad. Esta situación representa la caracterización de alrededor de un 35 % más de CVV mediante el análisis por HS-SPME (Tabla 10.2).

Timol fue el componente principal tanto en el AE como por HS-SPME, aunque en cantidades diferentes.

Comparando los resultados del análisis del AE y por HS-SPME, algunas similitudes y diferencias destacables fueron:

- (a) Todos los componentes que se encontraron en el AE se observaron también por HS-SPME. Sin embargo, muchos de los componentes hallados por HS-SPME no se encontraron en el aceite esencial: timil metil éter, timoquinona, carvona, bicicloelemeno, α -cubebeno, α -ylangeno, α -copaeno, neril acetato, β -bourboneno, β -elemeno, geranil acetato, β -gurjureno, γ -

elemeno, aristoleno, geranil acetona, α -elemeno, *allo*-aromadendreno, valenceno, cadina-1,4-dieno y óxido de cariofileno.

(b) Se observaron diferencias en las cantidades de algunos componentes entre HS-SPME y por análisis del AE. Los componentes que mayores diferencias en sus porcentajes mostraron fueron α -tujeno, α -pineno, *p*-cimeno, γ -terpineno, terpinen-4-ol, β -cariofileno y γ -cadineno.

Las diferencias encontradas en las cantidades de *p*-cimeno, γ -terpineno y 4-terpineol (más elevadas en el AE), se pueden explicar por reacciones de reordenamiento de sabineno, *cis* y *trans*-sabineno hidrato que ocurren durante la hidrodestilación (Figura 10.10) (Fischer *et al.*, 1987, 1988; Novak *et al.*, 2000).

Otros investigadores reportaron la composición del AE de orégano criollo de argentina (Dambolena *et al.*, 2010; Quiroga *et al.*, 2011; Asensio *et al.*, 2015), sin embargo las composiciones de volátiles reportadas tuvieron diferencias. Timol y *trans*-sabineno hidrato fueron los componentes mayoritarios hallados por Dambolena *et al.* (2010) (30,77 % y 29,63 % respectivamente) y Asensio *et al.* (2015) (17,1 % y 17,9 % respectivamente), mientras que para Quiroga *et al.* (2011), lo fueron timol y γ -terpineno (14,9 % y 18,2 % respectivamente). En este estudio se hallaron cantidades de timol similares a Dambolena *et al.* (2010) (23,0-27,3 %), cantidades mucho menores de *trans*-sabineno hidrato que las reportadas por Dambolena *et al.* (2010) y Asensio *et al.* (2015) y cantidades elevadas de γ -terpineno, más similares a las reportadas por Quiroga *et al.* (2011). La composición reportada en la literatura de los demás CVV de orégano criollo fue muy variable (Dambolena *et al.*, 2010; Quiroga *et al.*, 2011; Asensio *et al.*, 2015).

10.3.4- Caracterización de compuestos volátiles en “orégano chileno II”

A partir del análisis del AE de orégano chileno II, se hallaron 32 CVV diferentes, los cuales fueron identificados en su totalidad, mientras que por HS-SPME se encontraron 54, también identificados en su totalidad. Esta situación representa la caracterización de alrededor de un 41 % más de CVV mediante el análisis por HS-SPME (Tabla 10.2). Timol fue el componente principal tanto en el AE como por HS-SPME, aunque en concentraciones diferentes.

Comparando los resultados del análisis del AE y por HS-SPME, algunas similitudes y diferencias destacables fueron:

(a) En el AE se halló α -pineno que no se encontró por HS-SPME.

(b) Los componentes identificados que se encontraron por HS-SPME aunque no en el aceite esencial fueron 1-octen-3-ol acetato, *p*-menta-2-en-1-ol, alcohol β -fenchílico, *trans*-dihidrocarvona, timil metil éter, timoquinona, carvona, bicicloelemeno, α -cubebeno, α -ylangeno, α -copaeno, neril acetato, β -bourboneno, β -elemeno, geranil acetato, β -gurjureno, γ -elemeno, aromadendreno, aristoleno, geranil acetona, α -elemeno, valenceno y cadina-1,4-dieno.

(c) Se observaron diferencias en las cantidades de algunos componentes entre HS-SPME y el análisis del aceite esencial. Los componentes que mayores diferencias en sus porcentajes mostraron fueron α -tujeno, sabineno, *p*-cimeno, β -felandreno, *trans*-sabineno hidrato, terpinen-4-ol, *cis*-dihidrocarvona, timol y carvacrol.

Como se vio en los demás tipos de orégano, las notables diferencias encontradas en 4-terpineol se explican por las reacciones de reordenamiento que ocurren a las temperaturas extremas de la hidrodestilación (Figura 10.10) (Fischer *et al.*, 1987, 1988; Novak *et al.*, 2000).

No se encontraron reportes de la composición de la fracción volátil de orégano chileno II.

10.4- Caracterización de compuestos volátiles en muestras comerciales de orégano

La técnica optimizada de HS-SPME se utilizó para caracterizar la fracción volátil de nueve muestras comerciales de orégano (identificadas desde letras A hasta I). Se identificaron 56 CVV en total, lo que correspondió a más del 95 % del total de picos observados en los cromatogramas (Tabla 10.3). De ellos, sólo 20 resultaron comunes a todas las muestras: α -tujeno, sabineno, mirceno, α -terpineno, γ -terpineno, *trans*-sabineno hidrato, α -terpinoleno, *cis*-sabineno hidrato, linalool, 4-terpineol, α -terpineol, carvacrol metil éter, timol, carvacrol, β -cariofileno, α -cariofileno (α -humuleno), β -bisaboleno, δ -cadineno, spatulenol y óxido de cariofileno. Las estructuras químicas de algunos CVV se muestran en la figura 10.12.

Tabla 10.3. Componentes volátiles hallados en muestras comerciales de orégano por HS-SPME, usando una fibra DVB-CAR-PDMS 50/30 μm ; temperatura de extracción de 40 $^{\circ}\text{C}$; 10 minutos de equilibrio del HS y 60 minutos de exposición de la fibra en el HS. Se muestran valores promedios de tres determinaciones, cuyos coeficientes de variación fueron menores al 5 %.

N°	Compuesto ¹	KP ² (Exp)	KP ³ (Lit)	A	B	C	D	% ^{4, 5} E	F	G	H	I
1	α -tujeno	918	919	0,4 ^a	0,8 ^{a,b}	0,5 ^a	0,4 ^a	1,3 ^b	0,8 ^{a,b}	0,9 ^{a,b}	0,6 ^a	1,2 ^b
2	sabineno	963	964	0,7 ^a	1,4 ^{a,b}	0,7 ^a	0,7 ^a	2,5 ^c	1,5 ^{a,b}	1,7 ^{b,c}	1,1 ^{a,b}	2,6 ^c
3	1-octen-3-ol	977	978	0,2 ^b	ND ^a	0,1 ^{a,b}	0,1 ^{a,b}	ND ^a	ND ^a	ND ^a	0,1 ^{a,b}	ND ^a
4	mirreno*	982	983	0,7 ^{b,c}	0,4 ^{a,b}	0,9 ^c	0,8 ^{b,c}	0,9 ^{b,c}	0,6 ^{b,c}	0,1 ^a	0,5 ^{b,c}	0,5 ^{a,b,c}
5	α -felandreno	988	989	1,1 ^b	1,2 ^b	1,1 ^b	ND ^a	0,8 ^b	0,9 ^b	0,9 ^b	1,3 ^b	0,6 ^b
6	α -terpineno	998	993	1,8 ^b	1,7 ^b	2,3 ^b	0,6 ^a	2,4 ^b	1,9 ^b	1,7 ^b	2,1 ^b	1,8 ^b
7	<i>p</i> -cimeno	1008	1010	4,9 ^c	6,8 ^c	10,1 ^c	1,0 ^{a,b}	6,5 ^c	4,9 ^c	ND ^a	5,9 ^c	4,3 ^{b,c}
8	β -felandreno	1013	1012	3,0 ^b	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	2,3 ^b	ND ^a	ND ^a
9	<i>cis</i> -ocimeno	1027	1028	0,9 ^b	0,2 ^{a,b}	ND ^a	0,4 ^{a,b}	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a
10	<i>trans</i> - β -ocimeno	1032	1032	0,3 ^{a,b}	ND ^a	0,6 ^c	0,2 ^{a,b}	0,3 ^{b,c}	0,2 ^{a,b}	ND ^a	0,3 ^{a,b}	ND ^a
11	γ -terpineno	1047	1049	4,7 ^{b,c}	4,9 ^c	7,0 ^d	2,0 ^a	9,5 ^e	6,2 ^{e,d}	3,2 ^{a,b}	5,1 ^c	6,7 ^d
12	<i>cis</i> -sabineno hidrato	1086	1097	1,7 ^{a,b}	3,4 ^c	1,3 ^a	0,9 ^a	6,0 ^{e,d}	2,2 ^{a,b,c}	5,2 ^d	2,8 ^{b,c}	15,6 ^e
13	α -terpinoleno	1071	1072	1,1 ^{a,b}	1,0 ^{a,b,c}	1,0 ^{a,b}	0,3 ^a	1,1 ^c	0,7 ^{a,b,c}	0,7 ^{b,c}	1,1 ^{a,b,c}	0,9 ^c
14	<i>trans</i> -sabineno hidrato	1081	1089	3,5 ^{a,b,c}	4,3 ^{a,b,c,d}	1,6 ^a	2,3 ^{a,b}	7,2 ^e	7,3 ^d	5,7 ^{b,c,d}	2,1 ^a	5,9 ^{d,e}
15	linalol*	1090	1092	3,8 ^{a,b,c}	6,0 ^{b,c,d}	1,3 ^a	7,4 ^d	5,6 ^{b,c,d}	6,5 ^{e,d}	4,5 ^{a,b,c,d}	4,6 ^{a,b,c,d}	2,4 ^{a,b}
16	<i>p</i> -menta-2-en-1-ol	1100	1097	1,5 ^{c,d}	1,4 ^{b,c,d}	1,0 ^{b,c}	ND ^a	0,6 ^{a,b}	0,8 ^{a,b,c}	2,3 ^e	2,0 ^{d,e}	2,2 ^{d,e}
17	1-terpineol	1122	1130	1,2 ^c	1,1 ^c	0,5 ^{a,b,c}	ND ^a	0,3 ^{a,b}	0,5 ^{a,b,c}	0,9 ^{b,c}	1,2 ^c	0,8 ^{b,c}
18	borneol	1146	1152	ND ^a	ND ^a	0,5 ^b	0,3 ^{a,b}	ND ^a	ND ^a	0,4 ^b	0,4 ^{a,b}	0,1 ^{a,b}
19	4-terpineol	1162	1161	17,4 ^{d,e}	18,1 ^e	12,4 ^c	2,6 ^a	8,2 ^b	14,2 ^{c,d}	12,1 ^c	16,5 ^{d,e}	6,3 ^{a,b}
20	α -terpineol	1174	1172	4,5 ^a	3,7 ^{b,c}	3,1 ^{b,c}	0,9 ^a	2,0 ^{a,b}	2,9 ^{b,c}	3,1 ^{b,c}	3,0 ^{b,c}	2,6 ^b
21	estragol	1177	1188	ND ^a	ND ^a	ND ^a	0,4 ^b	0,4 ^b	1,0 ^c	1,0 ^c	0,9 ^c	ND ^a
22	linalil propanoato	1185	1215	ND ^a	1,8 ^{b,c}	2,7 ^d	ND ^a	1,5 ^b	1,7 ^{b,c}	1,5 ^b	2,1 ^c	ND ^a
23	<i>cis</i> -piperitol	1202	1199	1,4 ^c	0,3 ^b	0,3 ^b	ND ^a	ND ^a	0,2 ^{a,b}	ND ^a	0,3 ^b	ND ^a
24	timil metil éter	1215	1216	2,3 ^c	2,2 ^c	ND ^a	1,2 ^b	1,5 ^b	1,1 ^b	1,0 ^b	1,3 ^b	1,4 ^b
25	carvacrol metil éter	1225	1228	4,7 ^c	3,4 ^{b,c}	1,9 ^{a,b}	1,5 ^a	3,2 ^{b,c}	2,1 ^{a,b}	2,0 ^{a,b}	2,9 ^{a,b,c}	2,5 ^{a,b,c}
26	timoquinona	1232	1242	0,6 ^a	1,3 ^b	0,6 ^a	ND ^a	0,3 ^a	0,2 ^a	0,2 ^a	0,1 ^a	0,1 ^a
27	nerol	1234	1232	ND ^a	ND ^a	ND ^a	1,6 ^b	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a
28	linalil acetato	1249	1248	5,8 ^b	ND ^a	ND ^a	3,8 ^b	0,6 ^{a,b}	0,2 ^{a,b}	ND ^a	0,4 ^{a,b}	ND ^a

Tabla 10.3. Continuación.

Nº	Compuesto ¹	KI ² (Exp)	KI ³ (Lit)	A	B	C	D	% ^{4, 5}					I
29	<i>trans</i> -anetol	1262	1261	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	0,4 ^b	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a
30	carvona	1262	1265	ND ^a	ND ^a	0,2 ^b	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a
31	piperitona	1273	1282	ND ^a	0,2 ^b	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a
32	timol*	1292	1292	13,1 ^a	24,4 ^b	32,8 ^{c,d}	55,5 ^e	25,3 ^{b,c}	31,9 ^{b,c,d}	34,1 ^d	27,9 ^{b,c,d}	25,2 ^{b,c}	
33	carvacrol*	1295	1296	9,7 ^e	0,7 ^a	5,6 ^d	3,9 ^c	2,1 ^b	0,8 ^a	0,5 ^a	0,5 ^a	0,7 ^a	
34	α -cubebeno	1319	1322	ND ^a	ND ^a	0,1 ^{a,b}	0,1 ^{a,b}	ND ^a	0,2 ^b	ND ^a	0,1 ^{a,b}	0,3 ^{a,b}	
35	α -ylangeno	1325	1342	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	0,1 ^c	ND ^a	0,04 ^b	
36	α -copaeno	1343	1347	ND	0,1	0,1	ND	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	
37	neril acetato	1347	1345	0,2 ^b	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	
38	β -burboneno	1353	1356	ND ^a	0,3 ^b	0,1 ^b	0,2 ^{c,d}	0,2 ^{b,c}	0,1 ^b	0,2 ^{d,e}	0,2 ^{b,c}	0,2 ^{d,e}	
39	geranil acetato	1364	1364	0,2 ^{a,b}	ND ^a	ND ^a	0,5 ^b	ND ^a	ND ^a	ND ^a	0,1 ^{a,b}	ND ^a	
40	<i>n</i> -tetradecano	1378	1399	0,8	0,08	ND	0,1	ND	0,2	0,06	0,05	0,1	
41	β -cariofileno*	1387	1390	3,8 ^{e,f}	1,8 ^a	3,9 ^f	2,2 ^{a,b}	2,5 ^{b,c}	2,1 ^{a,b}	3,2 ^{d,e}	2,9 ^{c,d}	2,5 ^{b,c}	
42	β -cubebeno	1394	1395	ND ^a	0,1 ^b	0,2 ^b	0,2 ^b	0,1 ^b	0,1 ^b	0,2 ^b	0,1 ^b	0,2 ^b	
43	aromadendreno	1404	1439	0,2	ND	0,2	0,4	0,1	0,1	0,2	0,3	0,2	
44	α -cariofileno	1419	1423	0,5 ^f	0,2 ^{a,b}	0,4 ^{e,f}	0,2 ^a	0,3 ^{a,b,c}	0,3 ^{a,b,c}	0,4 ^{d,e}	0,3 ^{b,c,d}	0,3 ^{c,d,e}	
45	geranil acetona	1430	1436	0,2	0,2	0,2	ND	ND	0,2	0,2	0,1	0,2	
46	α -amorfeno	1445	1485	ND ^a	ND ^a	ND ^a	0,6 ^b	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	
47	germacreno D	1448	1455	ND ^a	0,5 ^b	1,0 ^{c,d}	ND ^a	1,2 ^d	0,9 ^c	1,6 ^e	0,9 ^c	2,0 ^f	
48	germacreno B	1464	1463	0,1 ^b	0,1 ^b	ND ^a	ND ^a	0,3 ^{c,d}	0,3 ^d	0,3 ^{c,d}	0,2 ^{b,c}	0,5 ^e	
49	α -muroleno	1469	1480	ND ^a	ND ^a	ND ^a	0,1 ^{c,d}	0,2 ^d	0,2 ^d	0,1 ^{b,c}	0,07 ^{a,b}	0,06 ^{a,b}	
50	β -bisaboleno	1482	1484	0,6 ^a	2,2 ^{c,d}	0,5 ^a	1,3 ^b	1,6 ^{b,c}	2,4 ^d	3,2 ^e	3,2 ^e	3,1 ^e	
51	δ -cadineno	1493	1495	0,2 ^a	0,2 ^a	0,5 ^b	0,4 ^{a,b}	0,3 ^{a,b}	0,4 ^{a,b}	0,4 ^{a,b}	0,3 ^{a,b}	0,4 ^{a,b}	
52	<i>cis</i> - α -bisaboleno	1511	1514	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	0,06 ^{a,b}	0,07 ^{a,b}	0,1 ^b	
53	elemicin	1536	1540	ND ^a	ND ^a	ND ^a	0,06 ^b	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	
54	spatulanol	1543	1537	0,5	0,2	0,4	0,4	0,2	0,2	0,5	0,4	0,4	
55	óxido de cariofileno	1546	1549	0,2	0,1	0,1	0,3	0,06	0,1	0,2	0,2	0,2	
56	salvial-4(14)-en-1-ona	1557	1568	ND ^a	ND ^a	ND ^a	0,07 ^{a,b}	ND ^a	ND ^a	0,1 ^b	0,1 ^{a,b}	0,1 ^{a,b}	
Totales				98,5	96,8	98,1	96,0	97,5	99,8	97,1	97,1	95,3	

¹ Identificado por GC-MS; ² Índices de retención de Kovat's experimentales; ³ Índices de retención de Kovat's de literatura; ⁴ Muestras comerciales de orégano desde A hasta I cuantificados por GC-FID. ⁵ Letras distintas indican diferencias significativas (p<0,05). *KI Determinados usando estándares de referencia. ND: compuesto no detectado.

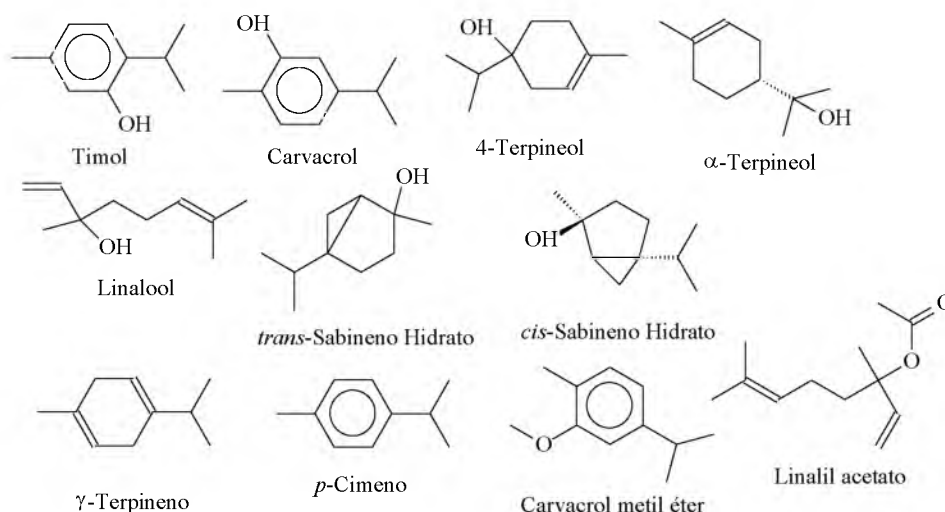


Figura 10.12. Algunos componentes volátiles hallados en las muestras de orégano comercial por muestreo mediante HS-SPME.³

En todas las muestras estudiadas, timol resultó ser el componente mayoritario a excepción de la muestra A. En dicha muestra 4-terpineol fue el compuesto que se observó en mayor concentración. La muestra C fue la que mayor porcentaje de timol presentó. Como se puede observar en la tabla 10.3, la composición fue diferente en cada muestra, incluso en los componentes principales.

A partir del análisis de varianza (ANOVA), no se observaron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre las muestras en cuanto a la composición de α-copaeno, *n*-tetradecano, aromadendreno, geranil acetona, spatulenol y óxido de cariofileno. En la composición de los demás compuestos se observaron diferencias significativas.

La gran variabilidad encontrada en la composición de la fracción volátil de las muestras comerciales, estaría indicando que las muestras son mezclas de diversos tipos de orégano, probablemente de diversos orígenes también. Es interesante observar que la muestra I tiene una concentración de *cis* y *trans*-sabineno hidrato invertida, en comparación con las muestras de orégano cultivadas en Córdoba, donde eran mayores las cantidades de *trans*-sabineno hidrato. Esto podría indicar que la muestra contiene *O. majorana*, ya que se ha reportado en la literatura que en dicho espécimen, la síntesis de *cis* y *trans*-sabineno hidrato es llevada a cabo por la misma enzima, la sabina-hidrato sintetasa, con una producción mayor de *cis*-sabineno hidrato que de *trans*-sabineno hidrato, a diferencia de los otros tipos de orégano, donde las concentraciones están invertidas (Novak *et al.*, 2000). De hecho, uno de los indicadores de su presencia es la concentración de ambos compuestos (Novak *et al.*, 2000).

³ Fuente de las estructuras químicas: Base de datos NIST: <http://webbook.nist.gov/chemistry/>

Cuando se realizó el análisis de PCA sobre la totalidad de componentes de la tabla 10.3, se obtuvieron ocho componentes principales, reuniendo las tres primeras el 68 % de la varianza total (Tabla 10.4). Las figuras 10.13, 10.14 y 10.15 muestran los gráficos de las tres primeras componentes rotadas (PC1 vs. PC2; PC1 vs PC3 y PC2 vs PC3). En los gráficos se puede observar que las muestras se separan en cinco grupos: B, E y F forman un grupo con características similares, H, G e I forman otro, mientras que A, C y D están separadas entre sí y del resto.

Tabla 10.4. Autovalores de la matriz de correlación del Análisis de Componentes Principales (PCA).

	PC 1	PC 2	PC 3	PC 4	PC 5	PC 6	PC 7	PCA 8
Autovalor	15,21	14,30	8,18	6,91	4,62	2,81	2,22	1,75
% de la varianza total	27	26	15	12	8	5	4	3

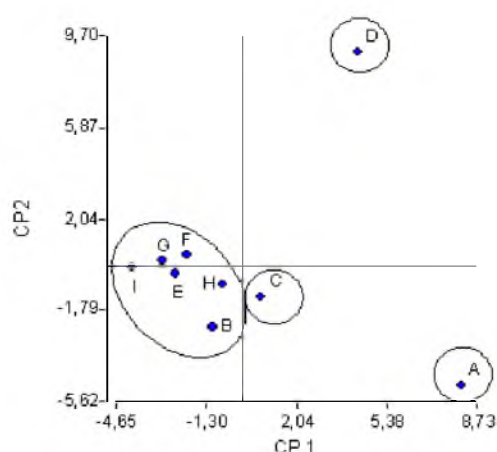


Figura 10.13. Gráfico de los componentes principales 1 y 2 rotados, resultantes del PCA sobre la matriz de correlación de los CVV presentes en las nueve muestras comerciales de orégano.

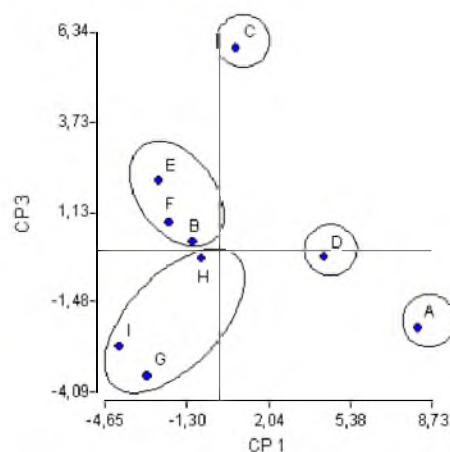


Figura 10.14. Gráfico de los componentes principales 1 y 3 rotados, resultantes del PCA sobre la matriz de correlación de los CVV presentes en las nueve muestras comerciales de orégano.

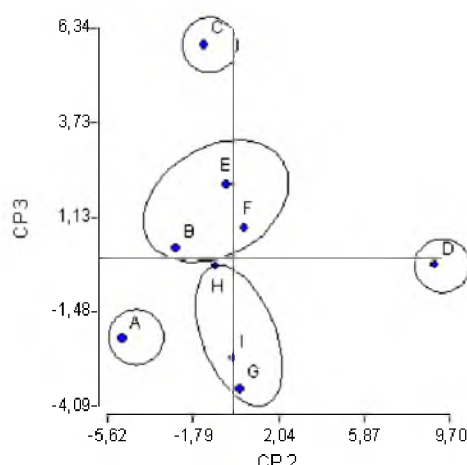


Figura 10.15. Gráfico de los componentes principales 2 y 3 rotados, resultantes del PCA sobre la matriz de correlación de los CVV presentes en las nueve muestras comerciales de orégano.

La figura 10.16 presenta el dendograma correspondiente a la evolución del agrupamiento de conglomerados en función de la distancia Euclídea para la composición de compuestos volátiles (en porcentaje), usando como criterio de clasificación las muestras comerciales de orégano. Fijando un criterio de corte arbitrario en la distancia 1,79 (50 % de la distancia máxima), la muestra D se separa del resto. Las muestras más alejadas entre sí son A y D, las muestras G, H e I forman un grupo, mientras que las muestras B, E y F forman otro. Las muestras A, C y D se separan entre sí y del resto, igual que los obtenidos con el PCA.

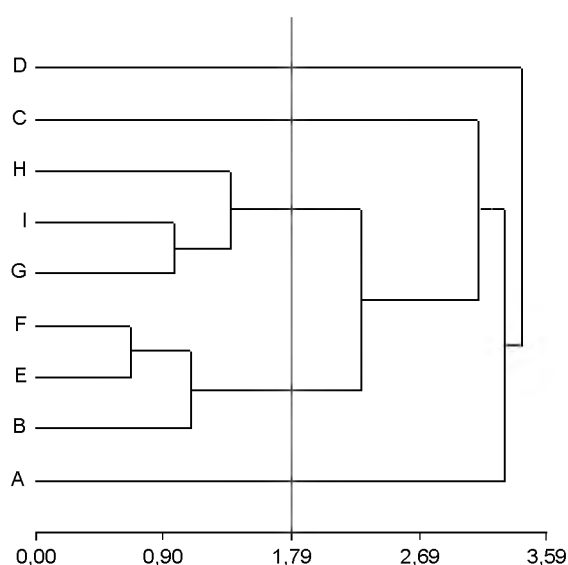


Figura 10.16. Dendograma obtenido al realizar un Análisis por Conglomerados jerárquicos con el método de encadenamiento promedio y distancia Euclídea sobre la base de la variedad de CVV de las muestras comerciales de orégano y las cuatro primeras componentes principales.

10.5- Análisis sensorial de las muestras orégano

La tabla 10.5 muestra las frecuencias porcentuales obtenidas a partir de la prueba de aceptabilidad sensorial, para cada categoría de la escala hedónica del atributo *sabor*. Se puede observar que el rango de categorías elegidas fue desde 1 (*Me disgusta muchísimo*) hasta 9 (*Me gusta muchísimo*). Las categorías más elegidas para el caso de la variable *sabor* fueron: 6 –*Me gusta ligeramente*- (muestras A, E, H), 7 –*Me gusta bastante*- (muestras B, C, D, I, orégano chileno II y mezcla 1:1 de orégano criollo y chileno II), 8 –*Me gusta mucho*- (muestras G y orégano criollo) y 9 –*Me gusta muchísimo*- (muestra F). En el caso de la muestra F, las categorías 6 –*Me gusta ligeramente*- y 9 –*Me gusta muchísimo*- tuvieron la misma frecuencia.

Tabla 10.5. Resultados de la prueba de aceptabilidad de orégano en cuanto al atributo *sabor*. Se muestran las frecuencias porcentuales obtenidas para cada categoría de la escala hedónica.

Categoría escala hedónica		Muestras de orégano %											
		A	B	C	D	E	F	G	H	I	OC ^a	OH ^b	M ^c
1	Me disgusta muchísimo	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0
2	Me disgusta mucho	0	0	3	0	0	1	0	0	0	0	0	0
3	Me disgusta bastante	4	3	3	0	0	3	1	0	1	0	0	0
4	Me disgusta ligeramente	13	10	3	8	4	9	1	6	9	0	2	5
5	Ni me gusta – ni me disgusta	8	14	21*	11	18	10	5	11	15	4	7	14
6	Me gusta ligeramente	35*	20*	19*	15	28*	23*	21*	26*	18*	10	27	26*
7	Me gusta bastante	28*	29*	23*	39*	25*	14	28*	25*	29*	36*	32*	31*
8	Me gusta mucho	4	19*	14	21*	23*	19*	29*	14	18*	46*	28*	14
9	Me gusta muchísimo	10	6	16	6	4	23*	14	16	10	3	4	10

^a Orégano criollo; ^b orégano chileno II; ^c mezcla de orégano criollo y chileno 1:1. * Categorías de mayor frecuencia porcentual relativa.

La tabla 10.6 muestra las frecuencias porcentuales obtenidas a partir de la prueba de aceptabilidad sensorial, para cada categoría de la escala hedónica del atributo *olor*. El rango de categorías elegidas fue desde 3 (*Me disgusta bastante*) hasta 9 (*Me gusta muchísimo*). Las categorías más elegidas para el caso de la variable *olor* fueron: 6 –*Me gusta ligeramente*- (muestras C, F, H, I) y 7 –*Me gusta bastante*- (muestras A, B, D, E, G, orégano criollo, orégano chileno II y mezcla 1:1 de orégano criollo y chileno).

Tabla 10.6. Resultados de la prueba de aceptabilidad de orégano en cuanto al atributo *olor*. Se muestran las frecuencias porcentuales obtenidas para cada categoría de la escala hedónica.

Categoría escala hedónica		Muestras de orégano %											
		A	B	C	D	E	F	G	H	I	OC ^a	OH ^b	Mc
1	Me disgusta muchísimo	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	Me disgusta mucho	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	Me disgusta bastante	0	1	2	0	0	0	0	1	0	0	0	0
4	Me disgusta ligeramente	7	4	6	2	2	8	1	3	2	0	1	1
5	Ni me gusta – ni me disgusta	11	9	13	5	16	12	9	11	14	11	7	7
6	Me gusta ligeramente	18*	22*	21*	23*	19*	21*	15	25*	19*	30*	29*	27
7	Me gusta bastante	21*	26*	18*	32*	22*	19*	28*	15	17*	33*	38*	31*
8	Me gusta mucho	18*	15	14	13	15	10	16	12	13	24	20	30*
9	Me gusta muchísimo	5	3	6	5	6	10	11	13	15	2	5	8

^a Orégano criollo; ^b orégano chileno II; ^c mezcla de orégano criollo y chileno 1:1. * Categorías de mayor frecuencia porcentual relativa.

Los valores promedios de aceptabilidad obtenidos para los atributos *sabor* y *olor* se muestran en las figuras 10.17 y 10.18 respectivamente, y en la tabla 10.7 se muestran los resultados de aceptabilidad para ambos atributos. Los promedios de aceptabilidad para el atributo *sabor* estuvieron comprendidos entre 6,2 (marca A) y 7,3 (orégano criollo), mientras que para el atributo *olor*, entre 6,4 (marca C) y 7,0 (marca G). A partir del análisis de los resultados, no se obtuvieron los mismos promedios para las variables *olor* y *sabor* en cada muestra. En el caso del atributo *olor*, la marca de menor promedio fue la C, mientras que en lo que respecta al atributo *sabor*, la marca de menor promedio fue la A. Para el atributo *olor* la marca de mayor promedio fue la G, mientras que en el atributo *sabor*, orégano criollo.

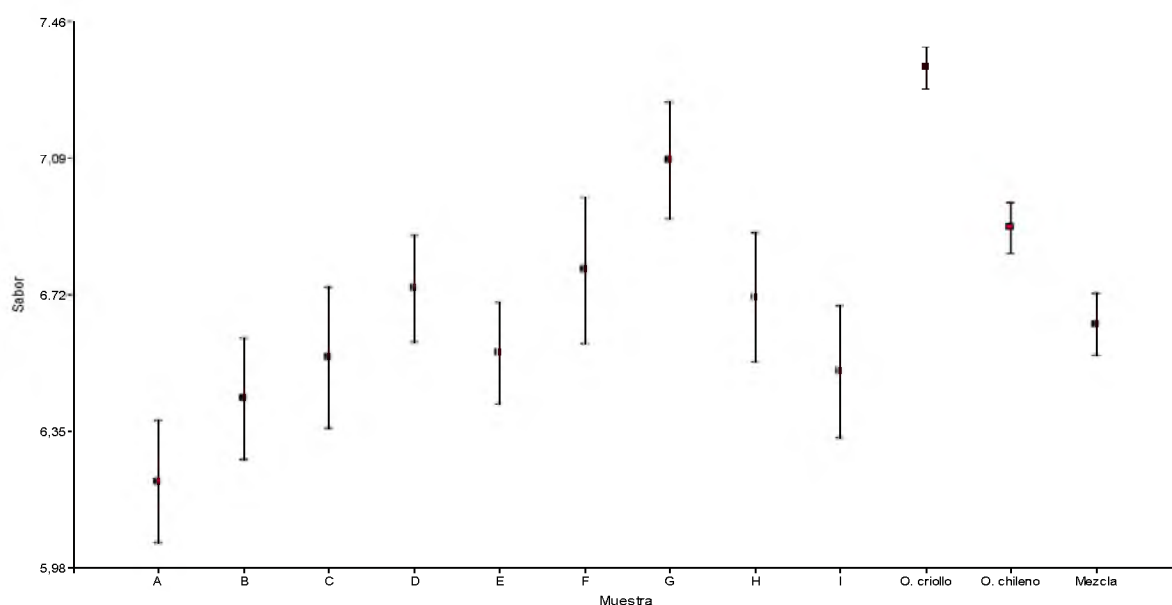


Figura 10.17. Promedios de aceptabilidad de orégano obtenidos para el atributo *sabor*.

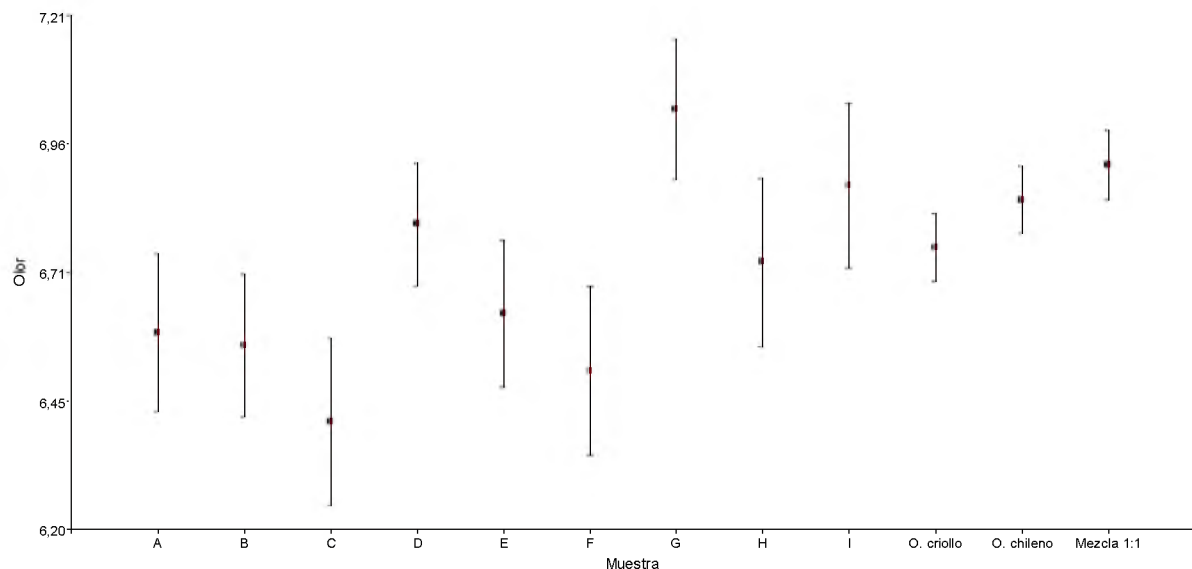


Figura 10.18. Promedios de aceptabilidad de orégano obtenidos para el atributo *olor*.

Tabla 10.7. Resultados de la prueba de aceptabilidad de orégano en cuanto los atributos *olor* y *sabor*. Se muestran medias y medianas para cada categoría de la escala hedónica.

Muestra	Atributos evaluados			
	Olor		Sabor	
	Media	Mediana	Media	Mediana
A	6,7 ± 1,4	7,00 ± 0,15	6,2 ± 1,5	6,00 ± 0,17
B	6,6 ± 1,2	7,00 ± 0,14	6,4 ± 1,5	7,00 ± 0,17
C	6,4 ± 1,5	6,00 ± 0,16	6,6 ± 1,7	7,00 ± 0,19
D	6,8 ± 1,1	7,00 ± 0,12	6,7 ± 1,3	7,00 ± 0,15
E	6,6 ± 1,3	7,00 ± 0,14	6,6 ± 1,2	7,00 ± 0,14
F	6,5 ± 1,5	6,00 ± 0,16	6,8 ± 1,8	7,00 ± 0,20
G	7,0 ± 1,2	7,00 ± 0,14	7,1 ± 1,4	7,00 ± 0,16
H	6,7 ± 1,5	6,50 ± 0,16	6,7 ± 1,6	7,00 ± 0,18
I	6,9 ± 1,4	7,00 ± 0,16	6,5 ± 1,6	7,00 ± 0,18
Orégano criollo	6,7 ± 1,0	7,00 ± 0,07	7,3 ± 0,9	7,00 ± 0,06
Orégano chileno	6,8 ± 1,0	7,00 ± 0,07	6,9 ± 1,0	7,00 ± 0,07
Mezcla 1:1 orégano criollo y chileno	6,9 ± 1,0	7,00 ± 0,07	6,6 ± 1,3	7,00 ± 0,09

Al aplicar a los resultados obtenidos, un análisis de varianza (ANOVA) no paramétrica (Kruskal-Wallis) y test posterior (prueba de Dunn) con un nivel de significancia del 5 % ($p < 0,05$), se observaron diferencias significativas en la aceptabilidad de las muestras para el atributo *sabor*, no así para el atributo *olor* (figura 10.19). A partir de los resultados se puede observar que las muestras de mayor aceptabilidad en cuanto al sabor fueron las de orégano criollo y la muestra comercial G, no habiendo diferencias significativas entre ellas. La muestra de menor aceptabilidad fue la muestra comercial A, aunque no se hallaron diferencias significativas entre ella y las muestras B, C, E, I y la mezcla 1:1 entre orégano criollo y

chileno II. Esto resultó muy llamativo porque cada uno de ellos por separado tuvo mayor aceptabilidad.

Se realizó también un Análisis de Conglomerados (CA), con el objetivo de observar el agrupamiento de las muestras según su aceptabilidad. La figura 10.20 muestra el dendograma correspondiente a la evolución del agrupamiento de conglomerados en función de la distancia Euclídea en función de los atributos de aceptabilidad (*olor* y *sabor*), usando como criterio de clasificación las muestras de orégano. Fijando un criterio de corte arbitrario en la distancia 2,02 todas las muestras se separan en dos grupos: uno formado por las muestras G y orégano criollo (Grupo 1) y el otro formado por el resto de las muestras (Grupo 2). El grupo formado por el resto de las muestras se separa a su vez en dos grupos: uno formado por las muestras D, H, I, orégano chileno II, y mezcla oréganos criollo y chileno II 1:1 (Grupo 2.1), y el otro formado por las muestras A, B, E, C y F (Grupo 2.2). El grupo 2.1 se separa en dos: uno formado por la muestra I y la mezcla 1:1 de orégano criollo y chileno II (que tienen la misma distancia) y el otro formado por las muestras D y H (que tienen la misma distancia) y la muestra de orégano (con distancia diferente a las de D y H). Finalmente, el grupo 2.2 se separa en dos: uno formado por las muestras C y F (que tienen la misma diostancia) y el otro formado por las muestras B y E (que tienen la misma distancia) y la muestra A (con distancia diferente a B y E).

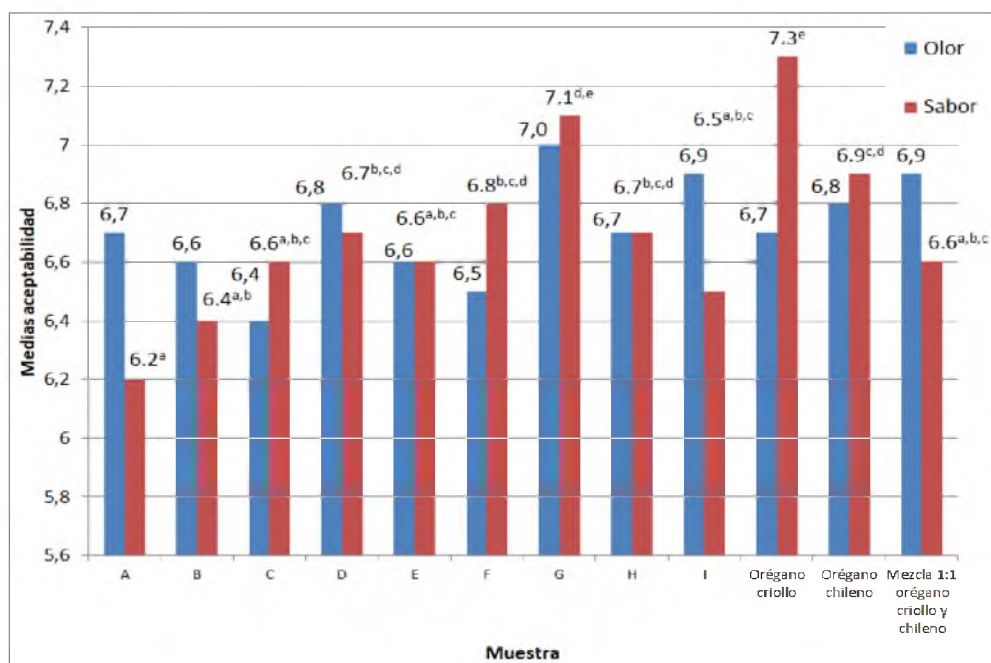


Figura 10.19. Medias de aceptabilidad en cuanto a *olor* y a *sabor* de muestras de orégano. Letras distintas en el atributo *sabor*, indican diferencias significativas entre las muestras (ANOVA Kruskal-Wallis, test Dunn, $\alpha=0,05$). En el atributo *olor* las diferencias no fueron significativas.

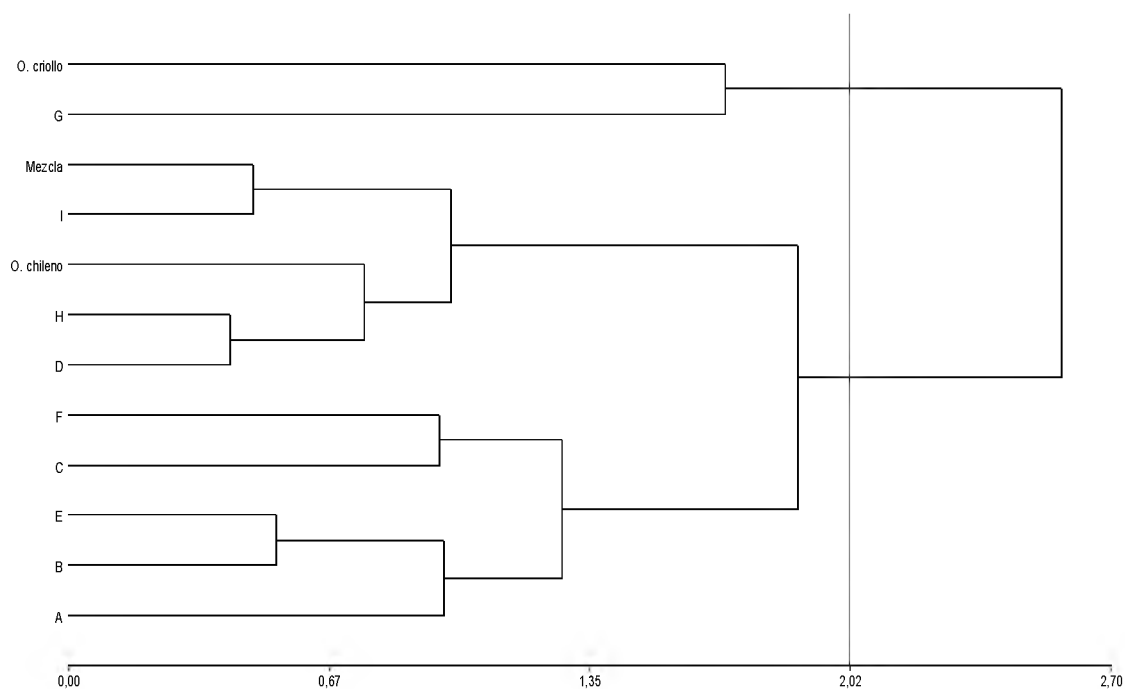


Figura 10.20. Dendrograma obtenido al realizar un Análisis por Conglomerados jerárquicos con el método de encadenamiento promedio y distancia Euclídea sobre la base de la variedad de aceptabilidad de las muestras comerciales de orégano.

Finalmente se realizó un Análisis de Componentes Principales (PCA) sobre la matriz de los atributos *olor* y *sabor* (variables) para cada muestra (criterio de clasificación). Se obtuvieron dos componentes principales (CP1 -72,7 %- y CP2 -27,3 %-) que asumieron el 100 % de la variabilidad total (figura 10.21). En el biplot del PCA se puede observar que la muestra más cercana al atributo *sabor* fue orégano criollo, mientras que las más cercanas al atributo *olor* fueron G, D, I, orégano chileno II y mezcla 1:1 entre orégano criollo y chileno II. La muestra H se encontró en el vértice de ambos atributos. Las muestras más alejadas de ambos atributos fueron: A, B, C, E y F.

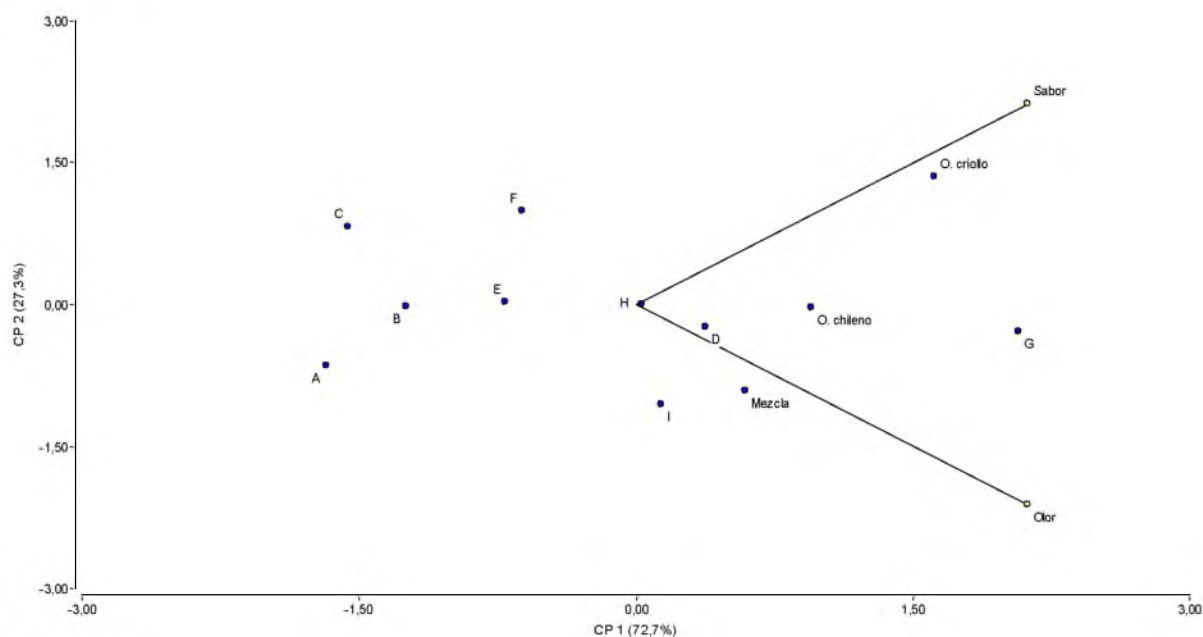


Figura 10.21. Biplot de las componentes principales 1 y 2 rotados, resultantes del PCA sobre la matriz de correlación de los atributos sabor y olor para las muestras de orégano.

10.6- Correlación entre datos químicos y sensoriales de las muestras de orégano comercial

En la tabla 10.8 se muestran los resultados de correlación entre las variables químicas y sensoriales. Se encontró correlación significativa ($p < 0,05$) entre componentes volátiles y la aceptabilidad de las muestras de orégano para los dos atributos evaluados (*olor* y *sabor*). En el caso del atributo *olor*, se hallaron correlaciones significativas *positivas* con los compuestos α -ylangeno ($r = 0,77$), *cis*- α -bisaboleno ($r = 0,76$) y salvial-4(14)-en-1-ona ($r = 0,87$); y correlación significativa *negativa* con el compuesto *p*-cimeno ($r = -0,73$). Por otra parte, en el caso de la variable *sabor*, se observó correlación significativa *positiva* con los compuestos estragol ($r = 0,94$), timol ($r = 0,80$) y α -nuroleno ($r = 0,76$).

Tabla 10.8. Correlación de Spearman ($\alpha = 0,05$) entre las medias de los atributos sensoriales (*olor* y *sabor*) y las cantidades de componentes volátiles presentes en muestras de orégano comercial. La correlación fue expresada como r (coeficiente de correlación). Se consideró correlación significativa cuando $p < 0,05$. En la tabla se muestran los valores r/p .

N°	Compuesto Orgánico Volátil	Atributo sensorial	
		Olor	Sabor
1	α -tujeno	0,20/0,57	0,25/0,48
2	sabineno	0,25/0,48	0,22/0,54
3	1-octen-3-ol	-0,18/0,60	-0,23/0,51
4	β -mirceno	-0,63/0,07	-0,22/0,54
5	α -felandreno	-0,40/0,25	0,05/0,90
6	α -terpineno	-0,40/0,26	0,02/0,96
7	<i>p</i> -cimeno	-0,73/0,04	-0,40/0,26
8	β -felandreno	0,50/0,16	0,30/0,40
9	<i>cis</i> -ocimeno	0,09/0,80	-0,25/0,49
10	<i>trans</i> - β -ocimeno	-0,52/0,14	-0,07/0,85
11	γ -terpineno	-0,42/0,24	-0,22/0,54
12	α -terpinoleno	-0,39/0,27	-0,42/0,23
13	<i>cis</i> -sabineno hidrato	0,27/0,45	0,13/0,71
14	<i>trans</i> -sabineno hidrato	0,35/0,32	0,03/0,92
15	linalool	0	0,42/0,24
16	<i>p</i> -menta-2-en-1-ol	0,43/0,22	-0,03/0,92
17	1-terpineol	0,05/0,89	-0,38/0,28
18	borneol	0,29/0,41	0,41/0,25
19	4-terpineol	-0,40/0,26	-0,35/0,32
20	α -terpineol	-0,25/0,48	-0,28/0,42
21	estragol	0,39/0,27	0,94/0,01
22	linalil propanoato	-0,40/0,26	0,17/0,64
23	<i>cis</i> -piperitol	-0,62/0,08	-0,56/0,11
24	timil metil éter	-0,13/0,71	-0,63/0,08
25	carvacrol metil éter	-0,17/0,64	-0,67/0,06
26	timoquinona	-0,57/0,11	-0,54/0,13
27	nerol	0,50/0,16	0,50/0,16
28	linalil acetato	0,05/0,89	-0,03/0,94
29	<i>trans</i> -anetol	0,13/0,72	0,58/0,10
30	carvona	0,05/0,89	0,28/0,44
31	piperitona	0,20/0,57	0,13/0,72
32	timol	0,27/0,45	0,80/0,02
33	carvacrol	-0,58/0,10	-0,40/0,26
34	α -cubebeno	-0,18/0,60	0,40/0,26
35	α -ylangeno	0,77/0,03	0,43/0,22
36	α -copaeno	-0,49/0,17	0,25/0,47
37	neril acetato	0,28/0,44	0,05/0,89
38	β -burboneno	0,56/0,11	0,18/0,61
39	geranil acetato	0,35/0,33	0,17/0,63
40	<i>n</i> -tetradecano	0,24/0,50	-0,29/0,42
41	β -cariofileno	0,10/0,78	-0,18/0,60
42	β -cubebeno	0,5/0,15	0,36/0,31
43	aromadendreno	0,35/0,32	0,38/0,28
44	α -cariofileno	0,05/0,88	-0,25/0,47
45	geranil acetona	-0,38/0,29	-0,38/0,28
46	α -amorfeno	0,50/0,16	0,50/0,16
47	germacreno D	0,35/0,33	0,32/0,36

Tabla 10.8. Continuación.

Nº	Compuesto Orgánico Volátil	Atributo sensorial	
		Olor	Sabor
48	germacreno B	0,38/0,28	0,28/0,44
49	α -muroleno	0,28/0,43	0,76/0,03
50	β -bisaboleno	0,58/0,10	0,4/0,26
51	δ -cadineno	-0,12/0,74	0,47/0,19
52	<i>cis</i> - α -bisaboleno	0,76/0,03	0,30/0,40
53	elemicin	0,50/0,16	0,50/0,16
54	spatulenol	0,33/0,35	0,18/0,60
55	óxido de cariofileno	0,46/0,19	-0,05/0,90
56	salvial-4(14)-en-1-ona	0,87/0,01	0,53/0,13

Las figuras 10.22 y 10.23 muestran los gráficos de correlación que resultaron estadísticamente significativos entre los CVV de las muestras de orégano comercial y sus atributos *olor* y *sabor* respectivamente. Teniendo en cuenta que los datos sensoriales no tienen una distribución normal, los gráficos muestran la tendencia seguida por aquellos compuestos volátiles que afectaron a los atributos sensoriales, esto es, aquellos cuyas pruebas de hipótesis establecieron que los coeficientes de correlación (r) eran estadísticamente diferentes de 0 (cero) para un nivel de significancia del 5 % ($\alpha=0,05$). Como se observa en los gráficos de las figuras 10.22 y 10.23, correspondientes a α -ylangeno, *cis*- α -bisaboleno, salvial-4(14)-en-1-ona, estragol y α -muroleno, en ausencia de dichos componentes, la variabilidad de resultados en los atributos sensoriales es elevada, probablemente debida al efecto del resto de componentes de las muestras, mientras que en presencia de los mismos la tendencia de los atributos sensoriales cambia.

A partir de los resultados de correlación lineal se utilizó un modelo de Regresión Lineal Múltiple (RLM) para las variables químicas que afectaron al atributo *olor* por un lado, y al atributo *sabor* por el otro. En ellos se consideraron los compuestos volátiles como variables independientes (X) y las medias de aceptabilidad como variables dependientes (Y) (Ecuación 10.1).

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \dots + \beta_n X_n$$

Ecuación 10.1

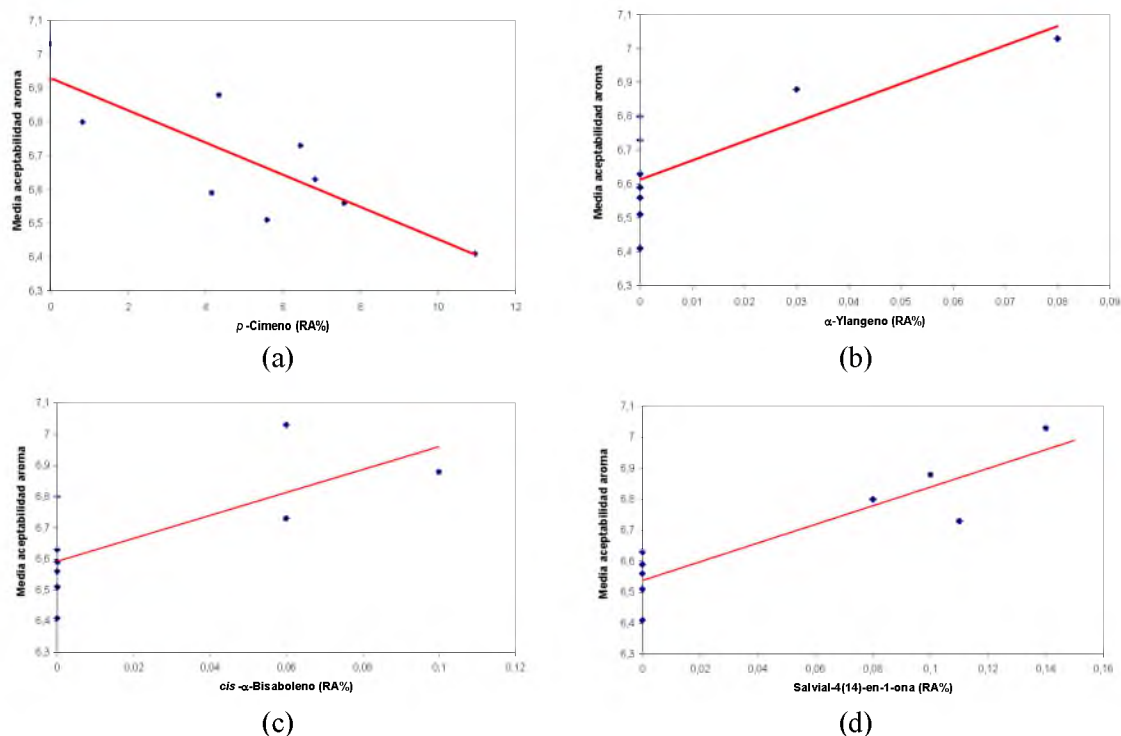


Figura 10.22. Gráficos de correlación lineal significativos entre las medias de aceptabilidad obtenidas para el atributo *olor* vs.: (a) p -cimeno; (b) α -ylangeno; (c) cis - α -bisaboleno y (d) salvia-4(14)-en-1-ona. Los coeficientes de correlación de Spearman (r) fueron $-0,93$; $0,77$; $0,76$ y $0,87$ respectivamente, los cuales resultaron estadísticamente significativos ($p < 0,05$) para un nivel de significancia del 5 % ($\alpha = 0,05$).

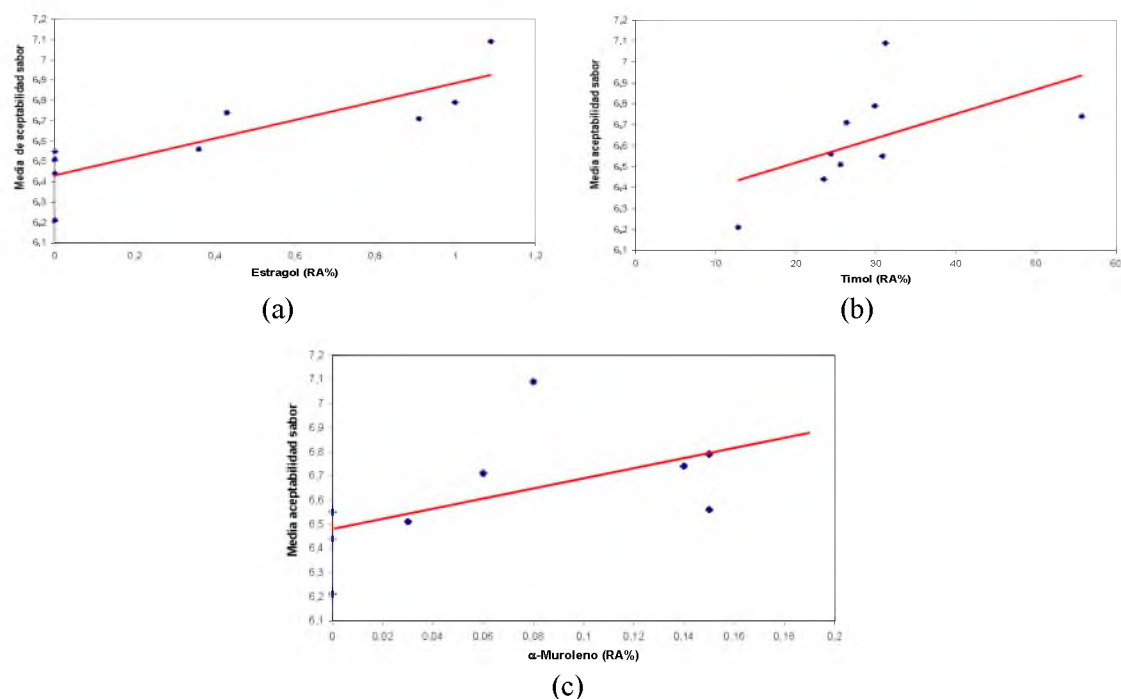


Figura 10.23. Gráficos de correlación lineal significativos entre las medias de aceptabilidad obtenidas para el atributo *sabor* vs.: (a) estragol; (b) timol y (c) α -muroleno. Los coeficientes de correlación de Spearman (r) fueron $0,94$; $0,80$ y $0,76$ respectivamente, los cuales resultaron estadísticamente significativos ($P < 0,05$) para un nivel de significancia del 5 % ($\alpha = 0,05$).

Se determinaron los estimadores estadísticos (b_0 –ordenada- y b_1 –pendiente-) y se aplicaron pruebas de hipótesis para verificar si eran significativos a un nivel de significancia del 5 % ($P < 0,05$). La tabla 10.9 muestra los estimadores estadísticos de la regresión con respecto a *olor* y *sabor*, todos con sus respectivos valores de p . En ellas se muestran también los respectivos coeficientes de determinación (R^2) del modelo.

Tabla 10.9. Estimadores de RLM para los atributos *olor* y *sabor*. El valor del coeficiente de determinación del modelo de RLM (R^2) fue 0,95.

Coeficiente de regresión lineal	Olor		Sabor	
	Estimador	p	Estimador	p
Ordenada (β_0)	6,73	<0,0001	6,22	<0,0001
<i>p</i> -cimeno (β_1)	-0,03	0,0065	-	-
α -ylangeno (β_2)	1,12	0,4008	-	-
<i>cis</i> - α -bisaboleno (β_3)	1,2	0,3361	-	-
salvial-4(14)-en-1-ona (β_4)	1,05	0,2929	-	-
estragol (β_1)	-	-	0,46	0,0112
timol (β_2)	-	-	0,01	0,0943
α -muroleno (β_3)	-	-	-0,75	0,4676

A partir de los coeficientes de determinación encontrados, el 95 % de la variabilidad en la aceptabilidad del atributo *olor* se puede explicar por la variabilidad de las cantidades relativas porcentuales de *p*-cimeno, α -ylangeno, *cis*- α -bisaboleno y salvial-4(14)-en-1-ona, mientras que el 85 % de la variabilidad en la aceptabilidad del *sabor* se puede explicar por la variabilidad de las cantidades relativas porcentuales de estragol, timol y α -muroleno. En ambos modelos de RLM, los estimadores de la ordenada (b_0) resultaron estadísticamente significativos ($p < 0,05$), mientras que sólo los estimadores de las pendientes de *p*-cimeno (b_1 , *olor*) y estragol (b_1 , *sabor*) resultaron estadísticamente significativos ($p < 0,05$).

En función de las correlaciones *positivas* encontradas se puede decir que el incremento de las concentraciones de α -ylangeno, *cis*- α -bisaboleno y salvial-4(14)-en-1-ona tendrían un efecto positivo aumentando la aceptabilidad del *olor* de las muestras de orégano, mientras que el incremento de las concentraciones de estragol, timol y α -muroleno tendría un efecto positivo, aumentando la aceptabilidad del *sabor* de las mismas muestras por parte de los consumidores.

A partir de la única correlación negativa encontrada, el aumento de la concentración de *p*-cimeno tendría un efecto negativo, disminuyendo la aceptabilidad del *olor* de las muestras de orégano por parte de los consumidores.

Los resultados obtenidos de la RLM indican que un alto porcentaje de la variabilidad en la aceptabilidad de los atributos estudiados es explicado por la variabilidad en la composición de los compuestos volátiles correlacionados. Además, los componentes que más afectaron al modelo de RLM fueron *p*-cimeno para la aceptabilidad del *olor* y estragol para la aceptabilidad del *sabor*.

4º PARTE:

CONCLUSIONES

Capítulo 11

Conclusiones finales

“El misterio es la cosa más bonita que podemos experimentar. Es la fuente de todo arte y ciencia verdadera”.

“Lo importante es no dejar de hacerse preguntas. La curiosidad tiene sus propias razones para existir”.

“Una cosa que aprendí en una vida larga es que toda nuestra ciencia, comparada con la realidad, es primitiva e infantil. Y sin embargo, es la cosa más preciada que tenemos”.

Albert Einstein

La aplicación de la técnica de HS-SPME para la determinación de los analitos volátiles presentes en las plantas aromáticas estudiadas en este trabajo, constituidas por mezclas complejas de terpenos y sesquiterpenos, requiere de la optimización de las condiciones de trabajo que son fundamentales para obtener precisión y reproducibilidad en los resultados. A partir de los datos hallados en este trabajo, el tipo de fase extractante, la temperatura y el tiempo de exposición de la fibra fueron las variables que más marcadamente afectaron al proceso de microextracción, mientras que el tiempo de equilibrio del HS fue la de menor influencia.

La fibra DVB-CAR-PDMS presentó la más alta eficiencia de la microextracción en todos los casos, ya que permitió la extracción simultánea de una gran cantidad de componentes volátiles de las muestras estudiadas. Esto demuestra que, para el caso de matrices complejas, las fibras recubiertas con mezclas de diversos polímeros poseen mayor eficiencia de extracción. Esto es coherente con lo reportado por otros investigadores, quienes también encontraron que la combinación de materiales sorbentes líquidos (PDMS) y sólidos (DVB y CAR), posibilitó la extracción de volátiles de un amplio rango de pesos moleculares y polaridad, lo que condujo a una sorción equilibrada de compuestos volátiles y semivolátiles.

La temperatura de extracción presentó una influencia significativa en las áreas de extracción ya que, cuando ella aumenta, se incrementan las concentraciones de algunos de los analitos volátiles en el HS. Sin embargo, su aumento también puede provocar desorción de algunos componentes desde la fibra y aparición de nuevos compuestos por descomposición de los ya

existentes. 40 °C resultó, en todos los casos, la menor temperatura posible que logró una buena eficiencia de microextracción de CVV.

Al no afectar mayormente al proceso, tiempos de equilibrio cortos (no mayores a 10 min) permitieron análisis más rápidos sin disminuir la eficacia de la microextracción. Sin embargo, el efecto del tiempo de exposición de la fibra sobre la HS-SPME fue muy variable, lo que implica que se trata de un proceso fuertemente condicionado por las características intrínsecas de la muestra en estudio, no siendo posible una generalización en la estandarización.

La HS-SPME resultó sistema analítico sencillo, rápido, selectivo, sensible y libre de solventes para la caracterización de compuestos volátiles de distintas especies del mismo género y de distintas variedades de la misma especie, encontrándose en cada caso, marcadores químicos claves para la identificación de cada especie:

- En el caso de *Tagetes filifolia*, los componentes claves para su identificación son estragol y *trans*-anetol, mientras que para diferenciar *T. argentina* de *T. minuta* se podrían utilizar *trans*-tagetona (con una proporción aproximadamente 3,6 veces mayor en *T. argentina*), *trans*-tagetenona (con una proporción aproximadamente 2 veces mayor en *T. argentina*) y anisol (con una proporción aproximadamente 11,2 veces mayor en *T. minuta*). *Iso*-terpinoleno podría ser un componente para identificar de *T. argentina*, mientras que para *T. minuta* podría ser *trans*-pinocarvil acetato, ambos presentes únicamente en dichas especies en una concentración mayor que el resto de los específicos.
- En la identificación de *Lantana balansae* son claves *cis* y *trans*-dihidrocarvona, y α -bisaboleno, mientras que para *L. grisebachii* lo son ledeno, α -amorfeno, β -selineno y epizonareno. En el caso de *L. cámara* los componentes específicos para su caracterización por estar presentes en todas las variedades (aunque en diversas concentraciones) son γ y *ar*-curcumeno, octan-3-ol, γ -terpineno, β -cubebeno y davanona.
- En la identificación de las semillas de coriandro cultivadas en Córdoba, los compuestos claves son linalool, γ -terpineno, α -pineno y alcanfor. Los estudios de almacenamiento mostraron que resultan claves para la evaluación del envejecimiento de las semillas α -pineno, limoneno, *trans*- β -ocimeno, γ -terpimeno, linalol y tetradecano.
- En el caso de *Clinopodium odorum*, los componentes claves para su identificación son mentona, pulegona (aproximadamente 58 veces más concentrado que en *C. gilliesi*) y *cis*-isopulegona (aproximadamente 40 veces más concentrado que en *C. gilliesi*),

mientras que para *C. gilliesi* se podrían utilizar germacren-4-ol, óxido de piperitenona (aproximadamente 200 veces más concentrado que en *C. odorum*), óxido de piperitona (aproximadamente 6 veces más concentrado que en *C. odorum*), biciclogermacreno y δ -cadineno, ambos aproximadamente 4 veces más concentrado que en *C. odorum*.

- En el caso de orégano, son claves para la caracterización de la variedad las proporciones de *cis* y *trans*-sabineno hidrato, timol, carvacrol, γ -terpineno, 4-terpineol y α -terpineol.

En todos los casos, con menor cantidad de muestra y tiempos de extracción más cortos, se lograron resultados comparables con los reportados en bibliografía para los aceites esenciales, lo cual, es particularmente importante para el análisis de grandes conjuntos de muestras. También es importante destacar que, en algunos casos, los resultados obtenidos por HS-SPME resultaron más representativos de la fracción de CVV originales de las plantas, en comparación con el AE, ya que, como se mostró en el caso de *C. odorum* y orégano, los AE contuvieron proporciones significativamente mayores de CVV producidos como resultado de las transformaciones químicas que ocurren durante la hidrodestilación. Sin embargo, algunas de las discrepancias encontradas en las proporciones de CVV entre HS-SPME e HD podrían también ser el producto de diferencias de afinidad de los agentes extractantes de las fibras por los analitos. Por lo tanto, es un desafío seguir buscando nuevas herramientas analíticas o nuevas modificaciones en las existentes, que permitan obtener las proporciones de CVV que reflejen la biosíntesis de las plantas aromáticas y no sean el resultado de los procesos analíticos llevados a cabo para su medición. Por ejemplo, Dawidowicz *et al.* (2016) realizaron una modificación en la técnica de HS-SPME que consistió en dispersar las muestras sólidas de las plantas en medios líquidos dentro de los viales, lo que logró reducir las discrepancias entre los datos obtenidos por esta metodología en comparación con otras. De ese modo lograron homogeneizar las constantes de distribución entre las fases planta/HS y HS/fibra para una diversidad de CVV.

Es de destacar que la potencialidad de la HS-SPME se vio amplificada a través del uso de las herramientas estadísticas utilizadas, en especial el análisis multivariado, ya que permitieron establecer similitudes y diferencias entre las muestras, así como también la clasificación y agrupamiento de las muestras en función de sus perfiles quimiométricos. Además, como se mostró en el estudio de semillas de coriandro, dicha combinación posibilitó encontrar correlaciones entre variables climáticas y fracciones aromáticas de semillas producidas en diferentes años y evaluar el efecto del almacenamiento sobre la composición de CVV de las semillas en silobolsa y en polvo. La técnica también fue especialmente útil para la

caracterización de CVV en plantas micropropagadas *in vitro* de *Clinopodium odorum*, ya que, como sólo se disponía de los pequeños plantines en los medios de cultivo, no hubiera sido posible la obtención de los AE. En el caso de los estudios que incorporaron datos químicos y sensoriales con herramientas estadísticas, fue posible establecer la influencia de algunos CVV presentes sobre el aroma y el sabor de orégano.

Además, los resultados aquí presentados pueden ser un aporte significativo de datos para el establecimiento de estándares de calidad de productos de importancia comercial para la Argentina, en general, y la región Córdoba, en particular, como son los casos de coriandro y orégano, los cuales están entre los principales productos aromáticos exportados por el país. En este sentido, los métodos de análisis a microescala desarrollados se podrían utilizar como herramientas de control de calidad de coriandro y orégano, y, teniendo en cuenta que las plantas en sus mecanismos adaptativos a las diferentes regiones geográficas pueden producir cambios en sus perfiles aromáticos, dichas herramientas analíticas podrían también contribuir a la denominación de origen de orégano y coriandro producidos en Córdoba.

Los resultados descritos en el presente trabajo pueden servir de base para propiciar estudios similares. En este sentido, en nuestro equipo de investigación actualmente se están llevando a cabo estudios tendientes a determinar el efecto del secado sobre la fracción volátil de los tipos de orégano producidos en Córdoba, además de aplicar la HS-SPME en el estudio de volátiles en otros especímenes también importantes de este sector productivo.

Anexo

Publicaciones derivadas del trabajo de tesis

Publicaciones en revistas científicas

1. Vázquez A.M., Demmel GI, Criado SG., Aimar ML, Cantero JJ, Rossi LI, Velasco MI. (2011). Phytochemistry of *Tagetes minuta* L. (Asteraceae) from Córdoba, Argentina: Comparative study between essential oil and HS-SPME analyses. Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas. 10 (4): 351 – 362. ISBN: 0717 7917. URL: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=85619300008>
2. Vázquez, AM, Aimar ML, Demmel GI, Criado SG, Ruiz GM, Cantero JJ, Rossi LI, Velasco MI (2011). Determination of Volatile Organic Compounds of *Tagetes argentina* Cabrera (Asteraceae) using HS-SPME analysis. Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas. 10 (5): 463 – 469. ISBN: 0717 7917. URL: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=85622430008>
3. Vázquez AM, Aimar ML, Demmel GI, Cabalén ME, Criado SG, Cantero JJ, Velasco MI, Rossi LI. (2013). Determination of volatile organic compounds of *Tagetes filifolia* Lag. (Asteraceae) from Córdoba (Argentina) using HS-SPME analysis. Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas. 12 (2): 143 - 149. ISBN: 0717 7917. URL: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=85625780003>
4. Vázquez AM, Aimar ML, Demmel GI, Cabalén ME, Decarlíni MF, Cantero JJ, Criado SG, Ruiz GM. (2014). Identification of volatile compounds of *Clinopodium odorum* (Lamiaceae): A comparison between HS-SPME and classic hydrodistillation. Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas. 13 (3), 285-296. http://www.blacpma.usach.cl/images/docs/013-003/009_articulo_7.pdf
5. Gastón MS, Cid MP, Vázquez AM, Decarlíni MF, Demmel GI, Rossi LI, Aimar ML, Salvatierra NA. (2016). Sedative effect of central administration of *Coriandrum sativum* essential oil and its major component linalool in neonatal chicks. Pharmaceutical Biology 54 (10), 1954-61. URL: <http://dx.doi.org/10.3109/13880209.2015.1137602>
6. Vázquez AM, Aimar ML, Decarlíni MF, Demmel GI, Cantero JJ, Ruiz GM (2016). Volatile Organic Constituents of *Clinopodium gilliesii* (Benth.) Kuntze: Analysis by HS-SPME and classic hydrodistillation. Revista Colombiana de Investigaciones

Publicaciones en documentos de trabajo de la Universidad Católica de Córdoba

1. Vázquez AM, Demmel GI, Ferrari MC, Criado SG, Nepote V, Grosso NR, Olmedo RH y Aimar ML (2010). Avances en el estudio de orégano. Documento de Trabajo DdT 065-010, Editorial EDUCC. 40 páginas.
2. Vázquez AM, Demmel GI, Cabalén ME, Criado SG, Aimar ML. (2012). Efecto de las variables analíticas en la determinación de componentes volátiles en plantas aromáticas por HS-SPME/GC-MS. Documento de Trabajo DdT 075-12, Editorial EDUCC. 23 páginas.

Trabajos presentados en eventos científicos

1. Demmel GI, Vázquez AM, Criado SG, Aimar ML y Cantero JJ. Determination of volatile organic compounds by HS-SPME/GC-MS in *Tagetes argentina* from Córdoba, Argentina. I Reunión Internacional de Ciencias Farmacéuticas (RICiFa), 24 y 25 de junio de 2010, Córdoba, Argentina. Proceedings en URL: http://www.fbioyf.unr.edu.ar/ricifa/ricifa2010_resumenes.pdf
2. Vázquez AM, Demmel GI, Criado SG, Aimar ML y Cantero JJ. Comparative Study of volatile organic compounds (VOC) by HS-SPME/GC-MS in fresh floescences of three *Tagetes* species from Córdoba, Argentina. I Reunión Internacional de Ciencias Farmacéuticas (RICiFa), 24 y 25 de junio de 2010, Córdoba, Argentina. Proceedings en URL: http://www.fbioyf.unr.edu.ar/ricifa/ricifa2010_resumenes.pdf
3. Vázquez AM, Demmel GI, Nepote V, Grosso NR, Criado SG, Olmedo RH y Ferrari MC. Estudio de correlación entre aceptabilidad sensorial y composición química de compuestos orgánicos volátiles de diferentes marcas comerciales de orégano. XII Congreso of the Internacional Jesuit Association of Chemistry and Chemical Engineering Universities and Schools (ISJACHEM / JINSEA). 5 al 8 de Julio de 2010, Córdoba, Argentina.

4. Vázquez AM, Demmel GI, Criado SG, Cantero JJ, Aimar ML, Cabalén ME. Caracterización de compuestos orgánicos volátiles en *Lantana balansae* Briquet originaria de Córdoba (Argentina) por SPME/GC-MS. XX Congreso Farmacéutico Argentino, 4 al 6 de agosto de 2011, San Luis, Argentina.
5. Vázquez AM, Demmel GI, Criado SG, Cantero JJ, Aimar ML, Cabalén ME. Caracterización de compuestos orgánicos volátiles en *Lantana grisebachii* Seckt originaria de Córdoba (Argentina) por SPME/GC-MS. XX Congreso Farmacéutico Argentino, 4 al 6 de agosto de 2011, San Luis, Argentina.
6. Vázquez AM, Maccari F, Piacenza V, Bertoldo P., Aimar ML. Development of antifungal formulations for external use from *Tagetes minuta* L. II Reunión Internacional de Ciencias Farmacéuticas (RICiFa), 22 y 23 de noviembre de 2012, Rosario de Santa Fe, Argentina. URL: <http://www.ricifa.com.ar/rosario2012.html>
7. Gastón S, Cid M, Vázquez AM, Aimar ML, Salvatierra NA. Effects of central administration of *Coriandrum sativum* essential oil on anxiety-like behavior in chicks. III Reunión Internacional de Ciencias Farmacéuticas (RICiFa), 18 y 19 de setiembre de 2014. Córdoba. Argentina. Proceeding en la revista International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research. URL: <http://ijpsr.com/wp-content/uploads/2015/05/Proceedings-RICiFa2014-Cordoba-ARGENTINA.pdf>

Bibliografía

- AAZZA, S.; LYOUSSI, B.; MIGUEL, M. G. Antioxidant and antiacetylcholinesterase activities of some commercial essential oils and their major compounds. *Molecules*, 2011, vol. 16, no 9, p. 7672-7690.
- ABDEL-HADY, N. M.; ABDEI-HALIM, A. S.; AL-GHADBAN, A. M. Chemical composition and insecticidal activity of the volatile oils of leaves and flowers of *Lantana camara* L. cultivated in Egypt. *Journal of the Egyptian Society of Parasitology*, 2005, vol. 35, no 2, p. 687-698.
- JABEEN, Q. [et al.]. Coriander fruit exhibits gut modulatory, blood pressure lowering and diuretic activities. *Journal of Ethnopharmacology*, 2009, vol. 122, no 1, p. 123-130.
- ABIDHUSEN, H. M.; SAWAPNIL, S. A.; AMIT, V. G. *Coriandrum sativum*-review of advances in phytopharmacology. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 2012, vol. 3, no 5, p. 1233.
- ABOU-JAWDAH, Y.; SOBH, H.; SALAMEH, A. Antimycotic activities of selected plant flora, growing wild in Lebanon, against phytopathogenic fungi. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2002, vol. 50, no 11, p. 3208-3213.
- ABURRÁ, R. E. [et al.]. Estudio del aceite esencial de *Tagetes filifolia* Lag. Como potencial productor de estragol y anisol. *Anales de la Asociación de Química Argentina*, 1990, vol. 78, p. 153 - 154.
- ACKERMAN, D. A natural history of the senses. Vintage, Random House. New York, USA, 1990.
- ADAM, K. [et al.]. Antifungal activities of *Origanum vulgare* subsp. *hirtum*, *Mentha spicata*, *Lavandula angustifolia* and *Salvia fruticosa* essential oils against human pathogenic fungi. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1998, vol. 46, no 5, p. 1739-1745.
- AFFEK, H. P.; YAKIR, D. Protection by isoprene against singlet oxygen in leaves. *Plant Physiology*, 2002, vol. 129, no 1, p. 269-277.
- AGA, M. [et al.]. Preventive effect of *Coriandrum sativum* (Chinese parsley) on localized lead deposition in ICR mice. *Journal of Ethnopharmacology*, 2001, vol. 77, no 2, p. 203-208.
- AGA, M. [et al.]. Preventive effect of *Coriandrum sativum* (Chinese parsley) on aluminum deposition in ICR Mice. *Natural Medicines*, 2002, vol. 56, no 5, p. 187-190.
- AGRAWAL, A. A. Current trends in the evolutionary ecology of plant defence. *Functional Ecology*, 2011, vol. 25, no 2, p. 420-432.
- AHARONI, A. [et al.]. Terpenoid metabolism in wild-type and transgenic Arabidopsis plants. *The Plant Cell*, 2003, vol. 15, no 12, p. 2866-2884.
- AHUMADA, I. [et al.]. Characterisation of the gene family encoding acetoacetyl-CoA thiolase in Arabidopsis. *Functional Plant Biology*, 2008, vol. 35, no 11, p. 1100-1111.

- AISSAOUI, A. [et al.]. Acute diuretic effect of continuous intravenous infusion of an aqueous extract of *Coriandrum sativum* L. in anesthetized rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 2008, vol. 115, no 1, p. 89-95.
- AKRAM, N. A.; ASHRAF, M. Regulation in plant stress tolerance by a potential plant growth regulator, 5-aminolevulinic acid. *Journal of Plant Growth Regulation*, 2013, vol. 32, no 3, p. 663-679.
- ALEJANDRO, S. [et al.]. AtABCG29 is a monolignol transporter involved in lignin biosynthesis. *Current Biology*, 2012, vol. 22, no 13, p. 1207-1212.
- ALI, N. A. [et al.]. Composition of essential oil from *Tagetes minuta* and its cytotoxic, antioxidant and antimicrobial activities. *Natural Product Communications*, 2014, vol. 9, no 2, p. 265-268.
- ALI, N. I. [et al.]. Nematicidal potential of *Lantana camara* against *Meloidogyne javanica* in mungbean. *Nematologia Mediterranea*, 2001, vol. 29, no 1, p. 99-102.
- ALIGIANNIS, N. [et al.]. Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum* species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2001, vol. 49, no 9, p. 4168-4170.
- AL-KALALDEH, J. Z.; ABU-DAHAB, R.; AFIFI, F. U. Volatile oil composition and antiproliferative activity of *Laurus nobilis*, *Origanum syriacum*, *Origanum vulgare*, and *Salvia triloba* against human breast adenocarcinoma cells. *Nutrition Research*, 2010, vol. 30, no 4, p. 271-278.
- AL-MOFLEH, I. A. [et al.]. Protection of gastric mucosal damage by *Coriandrum sativum* L. pretreatment in Wistar albino rats. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 2006, vol. 22, no 1, p. 64-69.
- AL-SAID, M. S. [et al.]. Post-coital antifertility activity of the seeds of *Coriandrum sativum* in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 1987, vol. 21, no 2, p. 165-173.
- ALTISENT, R. [et al.]. Regeneration of volatile compounds in Fuji apples following ultra low oxygen atmosphere storage and its effect on sensory acceptability. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2008, vol. 56, no 18, p. 8490-8497.
- ALVES, G. M.; GUERRA, M. P. Micropropagation for mass propagation and conservation of *Vriesea friburgensis* var. *paludosa* from microbuds. *Journal of the Bromeliad Society*, 2001, vol. 51, no 5, p. 202-212.
- ANDERSON, P.; ALBORN, H. Effects on oviposition behaviour and larval development of *Spodoptera littoralis* by herbivore-induced changes in cotton plants. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 1999, vol. 92, no 1, p. 45-51.
- ANDRIOTIS, V. M. [et al.]. Plastidial glycolysis in developing *Arabidopsis* embryos. *New Phytologist*, 2010, vol. 185, no 3, p. 649-662.
- ANITESCU, G.; DONEANU, C.; RADULESCU, V. Isolation of coriander oil: comparison between steam distillation and supercritical CO₂ extraction. *Flavour and Fragrance Journal*, 1997, vol. 12, no 3, p. 173-176.
- ANWAR, F. [et al.]. Physicochemical composition of hydro-distilled essential oil from coriander (*Coriandrum sativum* L.) seeds cultivated in Pakistan. *Journal of Medicinal Plants Research*, 2011, vol. 5, no 15, p. 3537-3544.
- ANZALDÚA-MORALES, A. La evaluación sensorial de los alimentos en la teoría y la práctica. Acribia, España, 2005.

- ARCEUSZ, A. [et al.]. Comparison of different extraction methods for the determination of α - and β -thujone in sage (*Salvia officinalis* L.) herbal tea. *Journal of Separation Science*, 2013, vol. 36, no 18, p. 3130-3134.
- ARCILA-LOZANO, C. C. [et al.]. El orégano: propiedades, composición y actividad biológica de sus componentes. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 2004, vol. 54, no 1, p. 100-111.
- ARGÜELLO, J. A. [et al.]. Sistema de producción y cadena de valor del cultivo de Orégano (*Origanum* sp.) en la Provincia de Córdoba (Argentina). *Phyton* (Buenos Aires), 2012, vol. 81, no 1, p. 23-34.
- ARGUETA VILLAMAR, A.; CANO ASSELEIH, L. M.; RODARTE, M. L. Atlas de las plantas de la medicina tradicional mexicana. Mexico: Instituto Nacional Indigenista 1786p. ISBN, 1994, p. 443-444.
- ARGYROPOULOU, C. [et al.]. Chemical composition of the essential oil from leaves of *Lippia citriodora* HBK (Verbenaceae) at two developmental stages. *Biochemical Systematics and Ecology*, 2007, vol. 35, no 12, p. 831-837.
- ARIAS TOLEDO, B. Diversidad de usos, prácticas de recolección y diferencias según género y edad en el uso de plantas medicinales en Córdoba, Argentina. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de plantas medicinales y aromáticas*, 2009, vol. 8, no 5, p. 389-401.
- ARIAS TOLEDO, B.; TRILLO, C.; GRILLI, M. Uso de plantas medicinales en relación al estado de conservación del bosque en Córdoba, Argentina. *Ecología austral*, 2010, vol. 20, no 3, p. 235-246.
- ARIMURA, G.; KOST, C.; BOLAND, W. Herbivore-induced, indirect plant defences. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 2005, vol. 1734, no 2, p. 91-111.
- ARIMURA, G. [et al.]. Herbivore-induced defense response in a model legume: Two-spotted spider mites, *Tetranychus urticae*, induce emission of (E)- β -ocimene and transcript accumulation of (E)- β -ocimene synthase in *Lotus japonicus*. *Plant Physiology*, 2004, vol. 135, no 4, p. 1976-1983.
- ARIMURA, G. [et al.]. Herbivore-induced volatiles induce the emission of ethylene in neighboring lima bean plants. *The Plant Journal*, 2002, vol. 29, no 1, p. 87-98.
- ARIMURA, G. [et al.]. Herbivory-induced volatiles elicit defense genes in lima bean leaves. *Nature*, 2000, vol. 406, p. 512-515.
- ARIZIO, O.; CURIONI, A. Documento 5: Productos aromáticos y medicinales. Estudio 1. EG. 33. 7. Estudios Agroalimentarios. Componente A: Fortalezas y debilidades del sector agroalimentario. Instituto Interamericano de Cooperación Agrícola (IICA)-CEPAL. 131 p. 2003.
- ARIZIO, O.; CURIONI, A. Mercado mundial y regional de coriandro (*Coriandrum sativum* L.). *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*, 2011, vol. 5, no 2, p. 263-278.
- ARIZIO, O. [et al.]. Coriandro (*Coriandrum sativum* L.). Agrotecnología, calidad y mercados, 33 pp. En: Curso Aromáticas de grano: Producción e inversión en mostaza blanca y coriandro. Agroconsultora Plus, sede Fundación ArgenINTA, Buenos Aires. 2010.
- ARTHUR, C. L.; PAWLISZYN, J. Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers. *Analytical Chemistry*, 1990, vol. 62, no 19, p. 2145-2148.

- ASENSIO, C. M.; GROSSO, N. R.; JULIANI, H. R. Quality characters, chemical composition and biological activities of oregano (*Origanum* spp.) essential oils from Central and Southern Argentina. *Industrial Crops and Products*, 2015, vol. 63, p. 203-213.
- ASENSIO, C. M.; NEPOTE, V.; GROSSO, N. R. Sensory attribute preservation in extra virgin olive oil with addition of oregano essential oil as natural antioxidant. *Journal of Food Science*, 2012, vol. 77, no 9, p. S1-S8.
- ASENSIO, C. M.; NEPOTE, V.; GROSSO, N. R. Consumers' acceptance and quality stability of olive oil flavoured with essential oils of different oregano species. *International Journal of Food Science & Technology*, 2013, vol. 48, no 11, p. 2417-2428.
- ASGARPANAH, J.; KAZEMIVASH, N. Phytochemistry, pharmacology and medicinal properties of *Coriandrum sativum* L. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 2012, vol. 6, no 31, p. 2340-2345.
- ÁVALOS GARCÍA, A.; PEREZ-URRIA CARRIL, E. Metabolismo secundario de plantas. *Reduca (Biología)*, 2011, vol. 2, no 3, p. 119-145.
- AVATO, P. [et al.]. Glandular hairs and essential oils in micropropagated plants of *Salvia officinalis* L. *Plant Science*, 2005, vol. 169, no 1, p. 29-36.
- AYALA, R. S.; DE CASTRO, M. L. Continuous subcritical water extraction as a useful tool for isolation of edible essential oils. *Food Chemistry*, 2001, vol. 75, no 1, p. 109-113.
- AYANOĞLU, F. [et al.]. Seed yields, yield components and essential oil of selected coriander (*Coriandrum sativum* L.) lines. *Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants*, 2002, vol. 9, no 2-3, p. 71-76.
- BABELUK, M. Contribution to the knowledge of the essential oils of *Origanum* species grown in Spain. Tesis de Magister en Farmacia. Universität Wien, Barcelona, España. 2013.
- BABU, G. D. K. [et al.]. Portable distillation apparatus for essential oils and hydrosols preparation. *Bulgarian Patent*, 2004, no 64393B1.
- BABU, G. D. K.; KAUL, V. K. Variations in quantitative and qualitative characteristics of wild marigold (*Tagetes minuta* L.) oils distilled under vacuum and at NTP. *Industrial Crops and Products*, 2007, vol. 26, no 3, p. 241-251.
- BAI, J. [et al.]. Isoprene and monoterpene emissions from an Inner Mongolia grassland. *Atmospheric Environment*, 2006, vol. 40, no 30, p. 5753-5758.
- BALASUBRAMANIAN, S.; PANIGRAHI, S. Solid-phase microextraction (SPME) techniques for quality characterization of food products: a review. *Food and Bioprocess Technology*, 2011, vol. 4, no 1, p. 1-26.
- BALDWIN, I. T. Plant volatiles. *Current Biology*, 2010, vol. 20, no 9, p. R392-R397.
- BALDWIN, I. T.; KESSLER, A.; HALITSCHKE, R. Volatile signaling in plant-plant-herbivore interactions: What is real? *Current Opinion in Plant Biology*, 2002, vol. 5, p. 351-354.
- BALTUSSEN, E. [et al.]. Stir bar sorptive extraction (SBSE), a novel extraction technique for aqueous samples: theory and principles. *Journal of Microcolumn Separations*, 1999, vol. 11, no 10, p. 737-747.
- BALZARINI, M. [et al.]. Infostat: software estadístico: manual del usuario. Editorial Brujas, Buenos Aires, Argentina. 2008.

- BANCHIO, E. [et al.]. Systemic induction of monoterpene biosynthesis in *Origanum* × *majoricum* by soil bacteria. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2009, vol. 58, no 1, p. 650-654.
- BANDONI, A. Los recursos vegetales aromáticos en Latinoamérica. Argentina. Editorial Universidad Nacional de la Plata. 2000.
- BANDONI, A. L.; MIZRAHI, I.; JUÁREZ, M. A. Composition and quality of the essential oil of coriander (*Coriandrum sativum* L.) from Argentina. *Journal of Essential Oil Research*, 1998, vol. 10, no 5, p. 581-584.
- BANKAR, R. [et al.]. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oil from seed of *Coriandrum sativum* L. *Analytical Chemistry Letters*, 2011, vol. 1, no 2, p. 189-193.
- BARANAUSKIENĖ, R. [et al.]. Harvesting time influences the yield and oil composition of *Origanum vulgare* L. ssp. *vulgare* and ssp. *hirtum*. *Industrial Crops and Products*, 2013, vol. 49, p. 43-51.
- BARATTA, M. T. [et al.]. Chemical composition, antimicrobial and antioxidative activity of laurel, sage, rosemary, oregano and coriander essential oils. *Journal of Essential Oil Research*, 1998, vol. 10, no 6, p. 618-627.
- BARBERA, D. [et al.]. Determination of terpene alcohols in Sicilian Muscat wines by HS-SPME-GC-MS. *Natural Product Research*, 2013, vol. 27, no 6, p. 541-547.
- BARBOZA, G. E. [et al.]. Medicinal plants: A general review and a phytochemical and ethnopharmacological screening of the native Argentine Flora. *Kurtziana*, 2009, vol. 34, no 1-2, p. 7-365.
- BARBOZA, G. E. [et al.]. Flora medicinal de la provincia de Córdoba (Argentina): Pteridófitas y Antofitas silvestres o naturalizadas. Museo Botánico Córdoba. 2006.
- BARRE, J. T. [et al.]. A bioactive triterpene from *Lantana camara*. *Phytochemistry*, 1997, vol. 45, no 2, p. 321-324.
- BARREYRO, R.; RINGUELET, J.; AGRÍCOLA, S. Fertilización nitrogenada y rendimiento en orégano (*Origanum x applii*). *Ciencia e Investigación Agraria*, 2005, vol. 32, no 1, p. 39-43.
- BARROS, L. [et al.]. (2012). Phenolic profiles of *in vivo* and *in vitro* grown *Coriandrum sativum* L. *Food Chemistry*, 2012, vol. 132, no 2, p. 841-848.
- BASILICO, M. Z.; BASILICO, J. C. Inhibitory effects of some spice essential oils on *Aspergillus ochraceus* NRRL 3174 growth and ochratoxin A production. *Letters in Applied Microbiology*, 1999, vol. 29, no 4, p. 238-241.
- BATISH, D. R. [et al.]. Potential utilization of dried powder of *Tagetes minuta* as a natural herbicide for managing rice weeds. *Crop Protection*, 2007, vol. 26, no 4, p. 566-571.
- BAYDAR, H. [et al.]. Antibacterial activity and composition of essential oils from *Origanum*, *Thymbra* and *Satureja* species with commercial importance in Turkey. *Food Control*, 2004, vol. 15, no 3, p. 169-172.
- BAYER, R. G. [et al.]. Mining the soluble chloroplast proteome by affinity chromatography. *Proteomics*, 2011, vol. 11, p. 1287-1299.
- BECK, H. C.; HANSEN, A. M.; LAURITSEN, F. R. Metabolite production and kinetics of branched-chain aldehyde oxidation in *Staphylococcus xylosus*. *Enzyme and Microbial Technology*, 2002, vol. 31, p. 94-101.

- BEEKWILDER, J. [et al.]. (2004). Functional characterization of enzymes forming volatile esters from strawberry and banana. *Plant Physiology*, 2004, vol. 135, p. 1865-1878.
- BEGNAMI, A. F. [et al.]. Antimicrobial potential of *Coriandrum sativum* L. against different *Candida* species in vitro. *Food Chemistry*, 2010, vol. 118, no 1, p. 74-77.
- BEGUM, S. [et al.]. Pentacyclic triterpenoids from the aerial parts of *Lantana camara* and their nematocidal activity. *Chemistry & Biodiversity*, 2008, vol. 5, no 9, p. 1856-1866.
- BÉJAOU, A. [et al.]. Essential oil composition and antibacterial activity of *Origanum vulgare* subsp. *glandulosum* Desf. at different phenological stages. *Journal of Medicinal Food*, 2013, vol. 16, no 12, p. 1115-1120.
- BELLIARDO, F. [et al.]. Headspace-solid-phase microextraction in the analysis of the volatile fraction of aromatic and medicinal plants. *Journal of Chromatographic Science*, 2006, vol. 44, no 7, p. 416-429.
- BELTRAN, J. [et al.]. Comparison of two quantitative GC-MS methods for analysis of tomato aroma based on purge-and-trap and on solid-phase microextraction. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2006, vol. 385, no 7, p. 1255-1264.
- BENDAHOU, M. [et al.]. Antimicrobial activity and chemical composition of *Origanum glandulosum* Desf. essential oil and extract obtained by microwave extraction: Comparison with hydrodistillation. *Food Chemistry*, 2008, vol. 106, no 1, p. 132-139.
- BENELLI, G. [et al.]. Larvicidal and repellent activity of the essential oil of *Coriandrum sativum* L. (Apiaceae) fruits against the filariasis vector *Aedes albopictus* Skuse (Diptera: Culicidae). *Parasitology Research*, 2013, vol. 112, no 3, p. 1155-1161.
- BENELLI, G. [et al.]. Synergized mixtures of Apiaceae essential oils and related plant-borne compounds: larvicidal effectiveness on the filariasis vector *Culex quinquefasciatus* Say. *Industrial Crops and Products*, 2017, vol. 96, p. 186-195.
- BENITES, J. [et al.]. Composition and biological activity of the essential oil of Peruvian *Lantana camara*. *Journal of the Chilean Chemical Society*, 2009, vol. 54, no 4, p. 379-384.
- BENYELLES, B. [et al.]. Essential oil from *Rhaponticum acaule* L. roots: Comparative study using HS-SPME/GC/GC-MS and hydrodistillation techniques. *Journal of Saudi Chemical Society*, 2014, vol. 18, no 6, p. 972-976.
- BENYOUSSEF, E. H.; SAIBI, S. Influence of essential oil composition on water distillation kinetics. *Flavour and Fragrance Journal*, 2013, vol. 28, no 5, p. 300-308.
- BERENBAUM, M. R.; ZANGERL, A. R. Facing the future of plantinsect interaction research: le retour à la "raison d'être". *Plant Physiology*, 2008, vol. 146, p. 804-811.
- BERNASCONI, M. L. [et al.]. Herbivore-induced emissions of maize volatiles repel the corn leaf aphid, *Rhopalosiphum maidis*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 1998, vol. 87, p. 133-142.
- BHAKTA, D.; GANJEWALA, D. Effect of leaf positions on total phenolics, flavonoids and proanthocyanidins content and antioxidant activities in *Lantana camara* (L.). *Journal of Scientific Research*, 2009, vol. 1, no 2, p. 363-369.

- BHATTACHARYA, S. Medicinal plants and natural products in amelioration of arsenic toxicity: A short review. *Pharmaceutical Biology*, 2017, vol. 55, no 1, p. 349-354.
- BHOURI, A. M. [et al.]. Aromatic compounds and soluble carbohydrate profiles of different varieties of Tunisian Raisin (*Vitis Vinifera* L.). *International Journal of Food Properties*, 2016, vol. 19, no 2, p. 339-350.
- BHUIYAN, M. N. I.; BEGUM, J.; SULTANA. M. Chemical composition of leaf and seed essential oil of *Coriandrum sativum* L. from Bangladesh. *Bangladesh Journal of Pharmacology*, 2009. Vol. 4, no 2, p. 150-153.
- BIANCHIN, J. N. [et al.]. Simultaneous determination of polycyclic aromatic hydrocarbons and benzene, toluene, ethylbenzene and xylene in water samples using a new sampling strategy combining different extraction modes and temperatures in a single extraction solid-phase microextraction-gas chromatography–mass spectrometry procedure. *Journal of Chromatography A*, 2012, vol. 1233, p. 22-29.
- BIANCHIN, J. N. [et al.]. Screening of volatile compounds in honey using a new sampling strategy combining multiple extraction temperatures in a single assay by HS-SPME–GC–MS. *Food Chemistry*, 2014, vol. 145, p. 1061-1065.
- BICK, J. A.; LANGE, B. M. Metabolic cross talk between cytosolic and plastidial pathways of isoprenoid biosynthesis: unidirectional transport of intermediates across the chloroplast envelope membrane. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2003, vol. 415, p. 146–154.
- BOFF, M. I. C.; ZOON, F. C.; SMITS, P. H. Orientation of *Heterorhabditis megidis* to insect hosts and plant roots in a Y-tube sand olfactometer. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 2001, vol. 98, p. 329–337.
- BOGUSZ, S. [et al.]. Optimization of the extraction conditions of the volatile compounds from chili peppers by headspace solid phase micro-extraction. *Journal of Chromatography A*, 2011, vol. 1218, no 21, p. 3345-3350.
- BOLAND, W. [et al.]. A “closed-loop-stripping” technique as a versatile tool for metabolic studies of volatiles. *Analysis of Volatiles*, 1984, p. 371-380.
- BOLEN, R. H.; GREEN, S. M. Use of olfactory cues in foraging by owl monkeys (*Aotus nancymai*) and capuchin monkeys (*Cebus apella*). *Journal of Comparative Psychology*, 1997, vol. 111, p. 152-158.
- BOLTER, C. J. [et al.]. Attraction of Colorado potato beetle to herbivore-damaged plants during herbivory and after its termination. *Journal of Chemical Ecology*, 1997, vol. 23, p. 1003– 1023.
- BOOTH, D. A. The cognitive basis of quality. *Food Quality and Preference*, 1995, vol. 6, p. 201-205.
- BORNEO, R. [et al.]. Antioxidant capacity of medicinal plants from the Province of Córdoba (Argentina) and their in vitro testing in a model food system. *Food Chemistry*, 2009, vol. 112, no 3, p. 664-670.
- BOUDA, H. [et al.]. Effect of essential oils from leaves of *Ageratum conyzoides*, *Lantana camara* and *Chromolaena odorata* on the mortality of *Sitophilus zeamais* (Coleoptera, Curculionidae). *Journal of Stored Products Research*, 2001, vol. 37, no 2, p. 103-109.
- BOULOGNE, I. [et al.]. Insecticidal and antifungal chemicals produced by plants: a review. *Environmental Chemistry Letters*, 2012, vol. 10, no 4, p. 325-347.
- BUKHOV, N. G. [et al.]. Heat sensitivity of chloroplasts and leaves: Leakage of protons from thylakoids and reversible activation of cyclic electron transport. *Photosynthesis Research*, 1999, vol. 59, p. 81-93.

- BURDOCK, G. A.; CARABIN, I. G. Safety assessment of coriander (*Coriandrum sativum* L.) essential oil as a food ingredient. *Food and Chemical Toxicology*, 2009, vol. 47, no 1, p. 22-34.
- BURGOS, Á. M.; CENÓZ, P. J.; KUSZRA, J. L. Ecofisiología del cultivo de Mandioca consociado con Albahaca y Coriandro en el Subtropico de Argentina. *FACENA*, 2016, vol. 31, p. 11-21.
- BUSATTA, C. [et al.]. Evaluation of *Origanum vulgare* essential oil as antimicrobial agent in sausage. *Brazilian Journal of Microbiology*, 2007, vol. 38, no 4, p. 610-616.
- BUSATTA, C. [et al.]. Application of *Origanum majorana* L. essential oil as an antimicrobial agent in sausage. *Food Microbiology*, 2008, vol. 25, no 1, p. 207-211.
- BUTTERY, R. G.; LING, L. C.; LIGHT, D. M. Tomato leaf volatile aroma components. *Journal of Agricultural and food Chemistry*, 1987, vol. 35, no 6, p. 1039-1042.
- CABANA, R. [et al.]. Effect of different extraction methodologies on the recovery of bioactive metabolites from *Satureja parvifolia* (Phil.) Epling (Lamiaceae). *Industrial Crops and Products*, 2013, vol. 48, p. 49-56.
- CALDERÓN, Á. I. [et al.]. Screening of Latin American plants for antiparasitic activities against malaria, Chagas disease, and leishmaniasis. *Pharmaceutical Biology*, 2010, vol. 48, no 5, p. 545-553.
- CÂMARA, J. D. S. [et al.]. Comparative study of the whisky aroma profile based on headspace solid phase microextraction using different fibre coatings. *Journal of Chromatography A*, 2007, vol. 1150, no 1, p. 198-207.
- CAMERONI, M. G. Hierbas Aromáticas y Especies. Informe Sectorial N° 9. Anual, 2012. Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca. Argentina. [Consulta: 10 de agosto de 2017]. Disponible en: <http://www.alimentosargentinos.gob.ar/contenido/sectores/sectores.php?secc=aromaticas>
- CAMPILLO, N. [et al.]. Gas chromatography with atomic emission detection for dimethylselenide and dimethyldiselenide determination in waters and plant materials using a purge-and-trap preconcentration system. *Journal of Chromatography A*, 2005, vol. 1095, no 1, p. 138-144.
- CANALIS, A. M. [et al.]. *In vivo* redox effects of *Aspidosperma quebracho-blanco* Schltdl., *Lantana grisebachii* Stuck and *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil. on blood, thymus and spleen of mice. *Indian Journal of Experimental Biology*, 2014, vol. 52, p. 882-889.
- CANE, D. E. Sesquiterpene biosynthesis: cyclization mechanisms. *Comprehensive Natural Products Chemistry*, 1999, vol. 2, p. 155-200.
- CAO, J. [et al.]. Solid-phase microextraction–gas chromatographic–mass spectrometric analysis of volatile compounds from *Curcuma wenyujin*. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2006, vol. 40, no 3, p. 552-558.
- CAPUZZO, A.; MAFFEI, M. E.; OCCHIPINTI, A. Supercritical fluid extraction of plant flavors and fragrances. *Molecules*, 2013, vol. 18, no 6, p. 7194-7238.
- CARDELLO, A. V. Food quality: conceptual and sensory aspects. *Food Quality and Preference*, 1995, vol. 6, p. 163-168.

- CARMO, E. S.; LIMA, E. D. O.; SOUZA, E. L. D. The potential of *Origanum vulgare* L.(Lamiaceae) essential oil in inhibiting the growth of some food-related *Aspergillus* species. Brazilian Journal of Microbiology, 2008, vol. 39, no 2, p. 362-367.
- CAROPRESE ARAQUE, J. F. [et al.]. Anatomía microscópica y metabolitos secundarios volátiles en tres estadios del desarrollo de las inflorescencias de *Lantana camara* (Verbenaceae). Revista de Biología Tropical, 2011, vol. 59, no 1, p. 473-486.
- CARPENTER, R. P. [et al.]. Análisis sensorial en el desarrollo y control de la calidad de alimentos. Acribia. Madrid. España. 2002.
- CARPINELLA, M. C. [et al.]. Screening for acetylcholinesterase inhibitory activity in plant extracts from Argentina. Phytotherapy Research, 2010, vol. 24, no 2, p. 259-263.
- CARVALHO, A. T. [et al.]. Nocturnal bees are attracted by widespread floral scents. Journal of Chemical Ecology, 2012, vol. 38, p. 315-318.
- CASETTI, F. [et al.]. Antimicrobial activity against bacteria with dermatological relevance and skin tolerance of the essential oil from *Coriandrum sativum* L. fruits. Phytotherapy Research, 2012, vol. 26, no 3, p. 420-424.
- CERVATO, G. [et al.]. Antioxidant properties of oregano (*Origanum vulgare*) Leaf extracts. Journal of Food Biochemistry, 2000, vol. 24, no 6, p. 453-465.
- CETIN, H. [et al.]. Acaricidal effects of the essential oil of *Origanum minutiflorum* (Lamiaceae) against *Rhipicephalus turanicus* (Acari: Ixodidae). Veterinary Parasitology, 2009, vol. 160, no 3, p. 359-361.
- CHALCHAT, J. C.; GARRY, R. P.; MUHAYIMANA, A. Essential oil of *Tagetes minuta* from Rwanda and France: chemical composition according to harvesting location, growth stage and part of plant extracted. Journal of Essential Oil Research, 1995, vol. 7, no 4, p. 375-386.
- CHAMORRO, E. R. [et al.]. Chemical composition of essential oil from *Tagetes minuta* L. leaves and flowers. The Journal of Argentine Chemical Society, 2008, vol. 96, no 1-2, p. 80-86.
- CHARAI, M.; MOSADDAK, M.; FAID, M. Chemical composition and antimicrobial activities of two aromatic plants: *Origanum majorana* L. and *O. compactum* Benth. Journal of Essential Oil Research, 1996, vol. 8, no 6, p. 657-664.
- CHEN, F. [et al.]. An *Arabidopsis thaliana* gene for methylsalicylate biosynthesis, identified by a biochemical genomics approach, has a role in defense. Plant Journal, 2003, vol. 36, p. 577-588.
- CHEN, F. [et al.]. Characterization of root-specific Arabidopsis terpene synthase responsible for the formation of the volatile monoterpene 1,8-cineole. Plant Physiology, 2004, vol. 135, p. 1956-1966.
- CHEN, F. [et al.]. The family of terpene synthases in plants: a mid-size family of genes for specialized metabolism that is highly diversified throughout the kingdom. Plant Journal, 2011, vol. 66, p. 212-229.
- CHEN, F. [et al.]. Biosynthesis and emission of terpenoid volatiles from Arabidopsis flowers. The Plant Cell, 2003, vol. 15, no 2, p. 481-494.

- CHEN, Y. [et al.]. Quality control and original discrimination of *Ganoderma lucidum* based on high-performance liquid chromatographic fingerprints and combined chemometrics methods. *Analitica Chimica Acta*, 2008, vol. 623, p. 146-156.
- CHENG, H. [et al.]. Differentiation of the volatile profiles of Chinese bayberry cultivars during storage by HS-SPME–GC/MS combined with principal component analysis. *Postharvest Biology and Technology*, 2015, vol. 100, p. 59-72.
- CHI, S.; ZIVANOVIC, S.; PENFIELD, M. P. Application of chitosan films enriched with oregano essential oil on bologna-active compounds and sensory attributes. *Revista de Agroquímica y Tecnología de Alimentos*, 2006, vol. 12, no 2, p. 111-117.
- CHITTKA, L.; RAINE, N. E. Recognition of flowers by pollinators. *Current Opinion in Plant Biology*, 2006, vol. 9, p. 428-435.
- CHORIANOPOULOS, N. [et al.]. Essential oils of *Satureja*, *Origanum*, and *Thymus* species: chemical composition and antibacterial activities against foodborne pathogens. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2004, vol. 52, no 26, p. 8261-8267.
- CHOWDHURY, J. U.; NANDI, N. C.; BHUIYAN, M. N. I. Chemical composition of leaf essential oil of *Lantana camara* L. from Bangladesh. *Bangladesh Journal of Botany*, 2007, vol. 36, no 2, p. 193-194.
- CHUNG, I. M. [et al.]. Immunotoxicity activity from the essential oils of coriander (*Coriandrum sativum*) seeds. *Immunopharmacology and Immunotoxicology*, 2012a, vol. 34, no 3, p. 499-503.
- CHUNG, I. M. [et al.]. Composition of the essential oil constituents from leaves and stems of Korean *Coriandrum sativum* and their immunotoxicity activity on the *Aedes aegypti* L. *Immunopharmacology and Immunotoxicology*, 2012b, vol. 34, no 1, p. 152-156.
- CIOANCA, O. [et al.]. Cognitive-enhancing and antioxidant activities of inhaled coriander volatile oil in amyloid β (1-42) rat model of Alzheimer's disease. *Physiology Behavior*, 2013, vol. 120, p. 193-202.
- CIRLINI, M. [et al.]. HS-SPME/GC–MS and chemometrics for the classification of Balsamic Vinegars of Modena of different maturation and ageing. *Food Chemistry*, 2011, vol. 124, no 4, p. 1678-1683.
- CITTADINI, M. C. [et al.]. Effects of oral phytoextract intake on phenolic concentration and redox homeostasis in murine encephalic regions. *Nutritional Neuroscience*, 2015, vol. 18, no 7, p. 316-322.
- CLARKSON, C. [et al.]. *In vitro* antiparasitic activity of medicinal plants native to or naturalised in South Africa. *Journal of Ethnopharmacology*, 2004, vol. 92, no 2, p. 177-191.
- COLE, L. K.; BLUM, M. S.; RONCADORI, R. W. Antifungal properties of the insect alarm pheromones citral, 2-heptanone, and 4-methyl-3-heptanone. *Mycologia*, 1975, vol. 67, p. 701-708.
- CONSEJO FEDERAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA (COFECYT) Proyectos Federales de Innovación Productiva – Eslabonamientos Productivos (PFIP-ESPRO): Estudios de las debilidades tecnológicas por sector. 2007.
- CONSEJO FEDERAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA (COFECYT). Proyectos Federales de Innovación Productiva – Eslabonamientos Productivos (PFIP-ESPRO): Debilidades y desafíos tecnológicos del sector productivo: Sector: Alimentos-Bebidas-Tabaco, Subsector: Hierbas naturales. 2013.

- COPOLOVICI, L. O. [et al.]. The capacity for thermal protection of photosynthetic electron transport varies for different monoterpenes in *Quercus ilex*. *Plant Physiology*, 2005, vol. 139, p. 485-496.
- COPOLOVICI, L. O.; NIINEMETS, Ü. Temperature dependencies of Henry's law constants and octanol/water partition coefficients for key plant volatile monoterpenoids. *Chemosphere*, 2005, vol. 61, no 10, p. 1390-1400.
- CORPAS, E. J. [et al.]. Comparison between extraction methods to obtain volátiles from lulo (*Solatum quitoense*) pulp. *Revista Colombiana de Química*, 2016, vol. 45, no 3, p. 12-21.
- CORTES-ESLAVA, J. [et al.]. Antimutagenicity of coriander (*Coriandrum sativum*) juice on the mutagenesis produced by plant metabolites of aromatic amines. *Toxicology Letter*, 2004, vol. 153, no 2, p. 283-292.
- COSTA, A. I. A.; DEKKER, M.; JONGEN, W. M. F. An overview of the means-end theory and its potential application to consumer-oriented food product design. *Trends in Food Science & Technology*, 2004, vol. 15, p. 403-415.
- COSTA, J. G. [et al.]. Chemical composition, evaluation of antibacterial activity and toxicity of the essential oils from *Lantana camara* L. and *Lantana* sp. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 2009, vol. 19, no 3, p. 710-714.
- COSTA, J. G. M. [et al.]. Composition and larvicidal activity of the essential oils of *Lantana camara* and *Lantana montevidensis*. *Chemistry of Natural Compounds*, 2010, vol. 46, no 2, p. 313-315.
- COSTELL, E. Análisis sensorial: Evolución, situación actual y perspectivas. *Industria y Alimentos Internacional*, 2000, vol. 2, p. 34-39.
- COSTELL, E. El análisis sensorial en el control y aseguramiento de la calidad de los alimentos: una posibilidad real. 2003. [Consulta: 10 de agosto de 2017]. Disponible en: http://digital.csic.es/bitstream/10261/5729/1/IATA_AGROCSIC_Analisis.pdf
- CRISINEL, A. S. [et al.]. A bittersweet symphony: Systematically modulating the taste of food by changing the sonic properties of the soundtrack playing in the background. *Food Quality and Preference*, 2012, vol. 24, no 1, p. 201-204.
- CROTEAU, R. [et al.]. Biochemical characterization of a spearmint mutant that resembles peppermint in monoterpene content. *Plant Physiology*, 1991, vol. 96, no 3, p. 744-752.
- CUEVAS-GLORY, L [et al.]. Floral classification of Yucatan Peninsula honeys by PCA & HS-SPME/GC-MS of volatile compounds. *International Journal of Food Science & Technology*, 2012, vol. 47, no 7, p. 1378-1383.
- CURIONI, A.; ARIZIO, O. El cultivo de coriandro, Capítulo I, p. 9-18. En: *Plantas Aromáticas y Medicinales Umbelíferas*. Edit. Hemisferio Sur S. A., Buenos Aires, Argentina, 1997.
- CURIONI, A. [et al.]. Análisis del mercado y tecnología de producción de Coriandro. Proyecto de Diversificación Productiva. Serie B, 1995, no 4, INTA - SAGyP, Buenos Aires, Argentina.
- D'AGOSTINO, M. F. [et al.]. Statistical analysis for improving data precision in the SPME GC-MS analysis of blackberry (*Rubus ulmifolius* Schott) volatiles. *Talanta*, 2014, vol. 125, p. 248-256.
- D'ANTUONO, L. F.; GALLETTI, G. C.; BOCCHINI, P. Variability of essential oil content and composition of *Origanum vulgare* L. populations from a North Mediterranean Area (Liguria Region, Northern Italy). *Annals of Botany*, 2000, vol. 86, no 3, p. 471-478.

- DA SILVA, M. H. L. [et al.]. The essential oils of *Lantana camara* L. occurring in North Brazil. *Flavour and Fragrance Journal*, 1999, vol. 14, no 4, p. 208-210.
- DADE, M. M. [et al.]. Total antioxidant capacity and polyphenol content of 21 aqueous extracts obtained from native plants of Traslasierra Valley (Argentina). *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 2009, vol. 8, no 6, p. 529-539.
- DAMBOLENA, J. S. [et al.]. Total phenolic content, radical scavenging properties, and essential oil composition of *Origanum* species from different populations. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2010, vol. 58, no 2, p. 1115-1120.
- DANLAMI, J. M. [et al.]. A comparative study of various oil extraction techniques from plants. *Reviews in Chemical Engineering*, 2014, vol. 30, no 6, p. 605-626.
- DARUGHE, F.; BARZEGAR, M.; SAHARI, M. A. Antioxidant and antifungal activity of Coriander (*Coriandrum sativum* L.) essential oil in cake. *International Food Research Journal*, 2012, vol. 19, no 3, p. 1253-260.
- DAVID, F.; SANDRA, P. Stir bar sorptive extraction for trace analysis. *Journal of Chromatography A*, 2007, vol. 1152, no 1, p. 54-69.
- DAWIDOWICZ, A. L. [et al.]. Application of PLE for the determination of essential oil components from *Thymus vulgaris* L. *Talanta*, 2008, vol. 76, no 4, p. 878-884.
- DAWIDOWICZ, A. L.; SZEWCZYK, J.; DYBOWSKI, M. P. Modified application of HS-SPME for quality evaluation of essential oil plant materials. *Talanta*, 2016, vol. 146, p. 195-202.
- DE ALMEIDA FREIRES, I. [et al.]. *Coriandrum sativum* L. (coriander) essential oil: antifungal activity and mode of action on *Candida* spp., and molecular targets affected in human whole-genome expression. *PLoS One*, 2014, vol. 9, no 6, p. 1-13.
- DE ALMEIDA MELO, E.; MANCINI FILHO, J.; GUERRA, N. B. Characterization of antioxidant compounds in aqueous coriander extract (*Coriandrum sativum* L.). *LWT-Food Science and Technology*, 2005, vol. 38, no 1, p. 15-19.
- DE BACKER, L. [et al.]. Betraying its presence: identification of the chemical signal released by *Tuta absoluta*-infested tomato plants that guide generalist predators toward their prey. *Arthropod-Plant Interactions*, 2017, vol. 11, no 2, p. 111-120.
- DE FALCO, E. [et al.]. Chemical composition and biological activity of essential oils of *Origanum vulgare* L. subsp. *vulgare* L. under different growth conditions. *Molecules*, 2013, vol. 18, no 12, p. 14948-14960.
- DE FEO, V. [et al.]. Composition of the essential oil of *Tagetes filifolia* Lag. *Flavour and Fragrance Journal*, 1998, vol. 13, no 3, p. 145-147.
- DE FIGUEIREDO, R. O. [et al.]. Composition of coriander essential oil from Brazil. *Acta Horticulturae*, 2004, vol. 629, p. 135-137.
- DE GRAZIA, S.; GIONFRIDDO, E.; PAWLISZYN, J. A new and efficient Solid Phase Microextraction approach for analysis of high fat content food samples using a matrix-compatible coating. *Talanta*, 2017, vol. 167, p. 754-760.

- DE JAGER, L. S.; PERFETTI, G. A.; DIACHENKO, G. W. Analysis of tetramethylene disulfotetramine in foods using solid-phase microextraction–gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 2008, vol. 1192, no 1, p. 36-40.
- DE MORAES, C. M. [et al.]. Herbivore infested plants selectively attract parasitoids. *Nature*, 1998, vol. 393, p. 570-574.
- DE MORAES, C. M.; MESCHEER, M. C.; TUMLINSON, J. H. Caterpillar-induced nocturnal plant volatiles repel nonspecific females. *Nature*, 2001, vol. 410, p. 577-580.
- DE PAULA, C. D.; GARCÍA, C. A.; DURANGO, A. M. Valor de la Marca en la Aceptación Sensorial de Consumidores en Cuatro Tipos de Pan Tajado Blanco. *Información Tecnológica*, 2014, vol. 25, no 1, p. 127-132.
- DE SOUSA, L. L. [et al.]. Efficacy of *Origanum vulgare* L. and *Rosmarinus officinalis* L. essential oils in combination to control postharvest pathogenic *Aspergilli* and autochthonous mycoflora in *Vitis labrusca* L. (table grapes). *International Journal of Food Microbiology*, 2013, vol. 165, no 3, p. 312-318.
- DE VASCONCELOS CABRAL, D. L. Relationship of biometric parameters on the concentration of tannins in two medicinal plants—a case study. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 2011, vol. 9, no 5, 368-376.
- DE VIANA, M. E. L.; TALENTI, E. C. J.; RETAMAR, J. A. Essential oils of *Lantana balansae*. *Essenze e Derivati Agrumari*, 1973, vol. 43, p. 299-306.
- DEBENEDETTI, S. [et al.]. *In vitro* antiplasmodial activity of extracts of Argentinian plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 2002, vol. 80, no 2, p. 163-166.
- DEKA, M. K.; SINGH, K.; HANDIQUE, R. Antifeedant and repellent effects of pongam (*Pongamia pinnata*) and wild sage (*Lantana camara*) on tea mosquito bug (*Helopeltis theivora*). *Indian journal of agricultural science*, 1998, vol. 68, no 5, p. 274-276.
- DEL VITTO, L. A.; PETENATTI, E. M.; PETENATTI, M. E. Recursos herbolarios de San Luis (República Argentina) primera parte: plantas nativas. *Multequina*, 1997, no 6. ISSN 0327-9375. Disponible en: <http://w.redalyc.org/articulo.oa?id=42800606>
- DELAQUIS, P. J. [et al.]. Antimicrobial activity of individual and mixed fractions of dill, cilantro, coriander and eucalyptus essential oils. *International Journal of Food Microbiology*, 2002, vol. 74, no 1, p. 101-109.
- DELWICHE, J. Thurstonian probabilistic approaches to new food product development. *Consumer Led Food Product Development*. H. MacFie, ed. Woodhead Publishing Limited, Cambridge, UK, 2007, p. 456-470.
- DEMIRCI, B.; DEMIRCI, F.; BAŞER, K. Headspace-SPME and hydrodistillation of two fragrant *Artemisia* sp. *Flavour and Fragrance Journal*, 2005, vol. 20, no 4, p. 395-398.
- DENG, C. [et al.]. Fast determination of curcuminol, curdione and germacrone in three species of *Curcuma* rhizomes by microwave-assisted extraction followed by headspace solid-phase microextraction and gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 2006, vol. 1117, no 2, p. 115-120.
- DESMARCHELIER, C. [et al.]. Antioxidant and prooxidant activities in aqueous extracts of Argentine plants. *International Journal of Pharmacognosy*, 1997, vol. 35, no 2, p. 116-120.

- DI FABIO, A. El cultivo y su efecto sobre la calidad en orégano. 2005. Disponible en: <http://www.caempa.com.ar>
- DÍAZ, M. S. [et al.]. *In vitro* propagation of muña-muña [*Clinopodium odorum* (Griseb.) Harley]. Biotechnology Research International, 2012, vol. 2012, 1-6.
- DÍAZ NAPAL, G. N. [et al.]. Screening of native plants from central Argentina against the leaf-cutting ant *Acromyrmex lundii* (Guerin) and its symbiotic fungus. Industrial Crops and Products, 2015, vol. 76, p. 275-280.
- DÍAZ-MAROTO, M. C. [et al.]. Influence of drying on the flavor quality of spearmint (*Mentha spicata* L.). Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2003, vol. 51, no 5, p. 1265-1269.
- DICKE, M. Are herbivore-induced plant volatiles reliable indicators of herbivore identity to foraging carnivorous arthropods? Entomologia Experimentalis et Applicata, 1999, vol. 91, p. 131-142.
- DICKE, M. Behavioural and community ecology of plants that cry for help. Plant, Cell & Environment, 2009, vol. 32, p. 654-665.
- DICKE, M. [et al.]. Plant strategies of manipulating predator-prey interactions through allelochemicals: Prospects for application in pest control. Journal of Chemical Ecology, 1990, vol. 16, p. 3091-3117.
- DICKE, M.; BALDWIN, I. T. The evolutionary context for herbivore-induced plant volatiles: beyond the 'cry for help'. Trends in Plant Science, 2010, vol. 15, p. 167-175.
- DICKE, M.; VAN LOON, J. J.; SOLER, R. Chemical complexity of volatiles from plants induced by multiple attack. Nature Chemical Biology, 2009, vol. 5, no 5, p. 317-324.
- DICKE, M.; VAN LOON, J. J. A. Multitrophic effects of herbivore-induced plant volatiles in an evolutionary context. Entomologia Experimentalis et Applicata, 2000, vol. 97, p. 237-249.
- DICKINSON, J. R. [et al.]. An investigation of the metabolism of isoleucine to active amyl alcohol in *Saccharomyces cerevisiae*. Journal of Biological Chemistry, 2000, vol. 275, p. 10937-10942.
- DIEDERICHSEN, A. Coriander: *Coriandrum Sativum* L (Vol. 3), Bioversity International. 1996.
- DIVYA, P.; PUTHUSSERI, B.; NEELWARNE, B. Carotenoid content, its stability during drying and the antioxidant activity of commercial coriander (*Coriandrum sativum* L.) varieties. Food Research International, 2012, vol. 45, no 1, p. 342-350.
- DOBSON, H. E. M.; BERGSTRÖM, G. The ecology and evolution of pollen odors. Plant Systematics and Evolution, 2000, vol. 222, p. 63-87.
- DOBSON, H. E. M.; BERGSTRÖM, G.; GROTH, I. Differences in fragrance chemistry between flower parts of *Rosa rugosa* Thunb. (Rosaceae). Israel Journal of Botany, 1990, vol. 39, p. 143-156.
- DONATH, J.; BOLAND, W. Biosynthesis of acyclic homoterpenes: enzyme selectivity and absolute configuration of the nerolidol precursor. Phytochemistry, 1995, vol. 39, no 4, p. 785-790.
- DONDO, G. [et al.]. Especies aromáticas, medicinales y condimentarias en la provincia de Entre Ríos. nJornada Técnica Problemática del Sector Aromático en la Región Pampeana, 2006, vol. 2006, p. 24-26.
- DONG, Y.; ZHANG, M.; LING, B. Antifeeding effects of crude lantadene from *Lantana camara* on *Plutella xylostella* and *Spodoptera litura* larvae. Ying yong sheng tai xue bao= The Journal of Applied Ecology, 2005, vol. 16, no 12, p. 2361-2364.

- DORMAN, H. D.; DEANS, S. G. Chemical composition, antimicrobial and in vitro antioxidant properties of *Monarda citriodora* var. *citriodora*, *Myristica fragrans*, *Origanum vulgare* ssp. *hirtum*, *Pelargonium* sp. and *Thymus zygis* oils. *Journal of Essential Oil Research*, 2004, vol. 16, no 2, p. 145-150.
- DORTA, E. [et al.]. Screening of phenolic compounds in by-product extracts from mangoes (*Mangifera indica* L.) by HPLC-ESI-QTOF-MS and multivariate analysis for use as a food ingredient. *Food Research International*, 2014, vol. 57, p. 51-60.
- DRUKKER, B. [et al.]. How predatory mites learn to cope with variability in volatile plant signals in the environment of their herbivorous prey. *Experimental and Applied Acarology*, 2000, vol. 24, p. 881-895.
- DUA, V. K.; PANDEY, A. C.; DASH, A. P. Adulticidal activity of essential oil of *Lantana camara* leaves against mosquitoes. *Indian Journal of Medical Research*, 2010, vol. 131, no 3, p. 434-439.
- DUDAREVA, N. [et al.]. The nonmevalonate pathway supports both monoterpene and sesquiterpene formation in snapdragon flowers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2005, vol. 102, no 3, p. 933-938.
- DUDAREVA, N. [et al.]. Evolution of floral scent in *Clarkia*: Novel patterns of S-linalool synthase gene expression in the *C. breweri* flower. *Plant Cell*, 1996, vol. 8, p. 1137-1148.
- DUDAREVA, N. [et al.]. Biosynthesis, function and metabolic engineering of plant volatile organic compounds. *New Phytologist*, 2013, vol. 198, no 1, p. 16-32.
- DUDAREVA, N. [et al.]. Plant volatiles: recent advances and future perspectives. *Critical Reviews in Plant Science*, 2006, vol. 25, p. 417-440.
- DUDAREVA, N.; PICHERSKY, E.; GERSHENZON, J. Biochemistry of plant volatiles. *Plant Physiology*, 2004, vol. 135, p. 1893-1902.
- DUFLOS, G. [et al.]. Freshness characterisation of whiting (*Merlangius merlangus*) using an SPME/GC/MS method and a statistical multivariate approach. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2010, vol. 90, no 15, p. 2568-2575.
- DUNKEL, F. V. [et al.]. Effects of steam-distilled shoot extract of *Tagetes minuta* (Asterales: Asteraceae) and entomopathogenic fungi on larval *Tetanops myopaeformis*. *Environmental Entomology*, 2010, vol. 39, no 3, p. 979-988.
- DUQUE-TOBÓN, S.; CARRERO-MANTILLA, J. I. Una implementación abierta y generalizada del modelo predictivo de Soave-Redlich-Kwong para el cálculo de la constante de la ley de Henry. *Ingeniería y Competitividad*, 2008, vol. 10, no 2, p. 9-28.
- DURÁN, L.; COSTELL, E. Review: Perception of taste. Physiochemical and psychophysical aspects. *Revista de Agroquímica y Tecnología de Alimentos*, 1999, vol. 5, no 4, p. 299-309.
- ECONOMOU, G. [et al.]. Variability in essential oil content and composition of *Origanum hirtum* L., *Origanum onites* L., *Coridothymus capitatus* (L.) and *Satureja thymbra* L. populations from the Greek island Ikaria. *Industrial Crops and Products*, 2011, vol. 33, no 1, p. 236-241.
- EGUALE, T. [et al.]. *In vitro* and *in vivo* anthelmintic activity of crude extracts of *Coriandrum sativum* against *Haemonchus contortus*. *Journal of Ethnopharmacology*, 2007, vol. 110, no 3, p. 428-433.

- EGUARAS, M. J. [et al.]. An in vitro evaluation of *Tagetes minuta* essential oil for the control of the honeybee pathogens *Paenibacillus larvae* and *Ascosphaera apis*, and the parasitic mite *Varroa destructor*. *Journal of Essential Oil Research*, 2005, vol. 17, no 3, p. 336-340.
- EL-DEEB, K. S. [et al.]. Chemical composition of the essential oil of *Tagetes minuta* growing in Saudi Arabia. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 2004, vol. 12, no 1, p. 51-53.
- ELECHOSA, M. A. [et al.]. Manual de recolección sustentable de plantas aromáticas nativas de la región central y noroeste de la Argentina. Ed. INTA, Buenos Aires, Argentina. 2009.
- ELGAYYAR, M. [et al.]. Antimicrobial activity of essential oils from plants against selected pathogenic and saprophytic microorganisms. *Journal of Food Protection*, 2001, vol. 64, no 7, p. 1019-1024.
- ELIAS, L.; WATTS, B. Métodos sensoriales básicos para la evaluación de alimentos. Canadá, Universidad de Manitoba, Facultad de Ecología Humana, Departamento de Alimentos y Nutrición/Instituto de Nutrición de Centroamérica y Panamá. 1992.
- EMAMGHOREISHI, M.; HEIDARI-HAMEDANI, G. Sedative-hypnotic activity of extracts and essential oil of coriander seeds. *Iranian Journal of Medicinal Sciences*, 2006, vol. 31, no 1, p. 22-27.
- EMAMGHOREISHI, M.; KHASAKI, M.; AAZAM, M. F. *Coriandrum sativum*: evaluation of its anxiolytic effect in the elevated plus-maze. *Journal of Ethnopharmacology*, 2005, vol. 96, no 3, p. 365-370.
- EMAMGHOREISHI, M.; KHASAKI, M.; AAZAM, M. F. *Coriandrum sativum* has anxiolytic and potentially sedative and muscle relaxant effects. *Molecular Cancer Therapeutics*, 2007, vol. 6, no 3, p. 1013-1021.
- ENGELBERTH, J. [et al.]. Airborne signals prime plants against insect herbivore attack. *Proceedings of the National Academy of Science of USA*, 2004, vol. 101, p. 1781-1785.
- ESPINOZA MANFUGÁS, J. M. Evaluación sensorial de los alimentos. Editorial Universitaria, Ministerio de Educación Superior, La Habana, Cuba. 2007.
- ESPINOZA MANFUGÁS, J. M. La ciencia sensorial. Su incidencia en la calidad del servicio de alimentos y bebidas y la satisfacción del cliente. *Revista Caribeña de Ciencias Sociales*, 2010, vol. 2014, no 6, p. 1-8.
- ESQUIVEL, A.; AGUILAR, P. V. Uso de aceites esenciales extraídos por medio de fluidos supercríticos para la elaboración de alimentos funcionales. *Tecnología en Marcha*, 2007, vol. 20, no 4, p. 41-50.
- FARAG, M. A. [et al.]. Metabolites profiling reveals for antimicrobial compositional differences and action mechanism in the toothbrushing stick “miswak” *Salvadora persica*. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2017, vol. 133, p. 32-40.
- FARAG, M. A. [et al.]. (Z)-3-Hexenol induces defense genes and downstream metabolites in maize. *Planta*, 2005, vol. 220, p. 900-909.
- FARHI, M. [et al.]. Identification of rose phenylacetaldehyde synthase by functional complementation in yeast. *Plant Molecular Biology*, 2010, vol. 72, p. 235-245.
- FARÍAS, G [et al.]. Morphological, yielding and quality descriptors of four clones of *Origanum* spp. (Lamiaceae) from the Argentine Littoral Region Germplasm bank. *Industrial Crops and Products*, 2010, vol. 32, no 3, p. 472-480.

- FARMER, E. E. Surface-to-air signals. *Nature*, 2001, vol. 411, p. 854-856.
- FARRE-ARMENGOL, G. [et al.]. Floral volatile organic compounds: Between attraction and deterrence of visitors under global change. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics*, 2013, vol. 15, p. 56- 67.
- FATOPE, M. O. [et al.]. Larvicidal activity of extracts and triterpenoids from *Lantana camara*. *Pharmaceutical biology*, 2002, vol. 40, no 8, p. 564-567.
- FERESIN, G. E. [et al.]. Antimicrobial activity of plants used in traditional medicine of San Juan province, Argentine. *Journal of Ethnopharmacology*, 2001, vol. 78, no 1, p. 103-107.
- FERRARI, S. [et al.]. Oligogalacturonides: plant damage-associated molecular patterns and regulators of growth and development. *Frontiers in Plant Science*, 2013, vol. 4, no 49, p. 1-9.
- FINESCHI, S. [et al.]. Diversification of volatile isoprenoid emissions from trees: evolutionary and ecological perspectives. En: *Biology, controls and models of tree volatile*. Edit. Ü. Niinemets and R. K. Monson (Berlin: Springer Science+Business Media B.V.), p. 1-20. 2013.
- FISCHER, N.; NITZ, S.; DRAWERT, F. Original flavour compounds and the essential oil composition of marjoram (*Majorana hortensis* Moench). *Flavour and Fragrance Journal*, 1987, vol. 2, no 2, p. 55-61.
- FISCHER, N.; NITZ, S.; DRAWERT, F. Original composition of marjoram flavor and its changes during processing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1988, vol. 36, no 5, p. 996-1003.
- FLORES, M. [et al.]. Correlations of Sensory and Volatile Compounds of Spanish “Serrano” Dry-Cured Ham as a Function of Two Processing Times. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1997, vol. 45, p. 2178-2186.
- FLÜGGE, U. I.; GAO, W. Transport of isoprenoid intermediates across chloroplast envelope membranes. *Plant Biology*, 2005, vol. 7, p. 91-97.
- FRACKNATH, S. Effects of phytoextracts and natural enemy to control *Plutella xylostella* L. (Lepidoptera: Plutellidae) in cabbage. *Allelopathy Journal*, 2006, vol. 17, p. 207-221.
- FREDERICO, É. H. F. F. [et al.]. Anti-viral effects of medicinal plants in the management of dengue: A systematic review. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative medicines (AJTCAM)*, 2017, vol. 14, no 4S, p. 33-40.
- FURUMOTO, T. [et al.]. A plastidial sodium-dependent pyruvate transporter. *Nature*, 2011, vol. 476, no 7361, p. 472-475.
- FUSELLI, S. R. [et al.]. Susceptibility of the honeybee bacterial pathogen *Paenibacillus larvae* to essential oils distilled from exotic and indigenous Argentinean plants. *Journal of Essential Oil Research*, 2008, vol. 20, no 5, p. 464-470.
- GAMBORG, O. L.; MILLER, R.; OJIMA, K. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Experimental Cell Research*, 1968, vol. 50, no 1, p. 151-158.
- GAO, L. [et al.]. Fast determination of paraquat in plasma and urine samples by solid-phase microextraction and gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 2014, vol. 944, p. 136-140.
- GARCIA, C. C. [et al.]. Virucidal activity and chemical composition of essential oils from aromatic plants of central west Argentina. *Natural Product Communications*, 2010, vol. 5, no 8, p. 1307-1310.

- GARCIA, M. A.; SANZ, J. Analysis of *Origanum vulgare* volatiles by direct thermal desorption coupled to gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 2001, vol. 918, no 1, p. 189-194.
- GARCÍA-GONZÁLEZ, D. L. [et al.]. Relationship between sensory attributes and volatile compounds qualifying dry-cured hams. *Meat Science*, 2008, vol. 80, p. 315-325.
- GASTÓN, M. S. [et al.]. Sedative effect of central administration of *Coriandrum sativum* essential oil and its major component linalool in neonatal chicks. *Pharmaceutical Biology*, 2016, vol. 54, no 10, p. 1954-1961.
- GENDE, L. B. [et al.]. Essentials oils of some *Mentha* spp. and their relation with antimicrobial activity against *Paenibacillus larvae*, the causative agent of American foulbrood in honey bees, by using the bioautography technique. *Bulletin of Insectology*, 2014, vol. 67, no 1, p. 13-20.
- GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; DE KLERK, G. J. (ed.). *Plant propagation by tissue culture: Volume 1. The background*. Springer Science & Business Media, 2007.
- GERSHENZON, J.; MCCONKEY, M. E.; CROTEAU, R. B. Regulation of monoterpene accumulation in leaves of peppermint. *Plant Physiology*, 2000, vol. 122, no 1, p. 205-214.
- GHAMARNIA, H.; DAICHIN, S. Effect of different water stress regimes on different Coriander (*Coriander sativum* L.) parameters in a semi-arid climate. *International Journal of Agronomy and Plant Production*, 2013, vol. 4, no 4, p. 822-832.
- GHASEMZADEH, A. [et al.]. Plant-growth regulators alter phytochemical constituents and pharmaceutical quality in Sweet potato (*Ipomoea batatas* L.). *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 2016, vol. 16, no 152, p. 1-13.
- GHIASVAND, A. R. [et al.]. Chemical characterization of cultivated *Tagetes minuta* L. by use of ultrasound-assisted head space SPME and GC–MS. *Chromatographia*, 2011, vol. 73, no 9, p. 1031-1035.
- GHISALBERTI, E. L. *Lantana camara* L.(verbenaceae). *Fitoterapia*, 2000, vol. 71, no 5, p. 467-486.
- GHORBANI, A. [et al.]. Effects of *Coriandrum sativum* extracts on glucose/serum deprivation-induced neuronal cell death. *Avicenna Journal of Phytomedicine*, 2012, vol. 2, no 1, p. 4-9.
- GHOSH, S. [et al.]. Anti-inflammatory and anticancer compounds isolated from *Ventilago madraspatana* Gaertn., *Rubia cordifolia* Linn. and *Lantana camara* Linn. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 2010, vol. 62, no 9, p. 1158-1166.
- GIL, A. [et al.]. Coriander (*Coriandrum sativum* L.) yield response to plant populations. *Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants*, 1999, vol. 6, no 3, p. 63-73.
- GIL, A.; GHERSA, C. M.; LEICACH, S. Essential oil yield and composition of *Tagetes minuta* accessions from Argentina. *Biochemical Systematics and Ecology*, 2000, vol. 28, no 3, p. 261-274.
- GIORGIS, M. A. [et al.]. Composición florística del Bosque Chaqueño Serrano de la provincia de Córdoba, Argentina. *Kurtziana*, 2011, vol. 36, no 1, p. 9-43.
- GLEISER, R. M.; BONINO, M. A.; ZYGADLO, J. A. Repellence of essential oils of aromatic plants growing in Argentina against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Parasitology Research*, 2011, vol. 108, no 1, p. 69-78.

- GOFF, S. A.; KLEE, H. J. Plant volatile compounds: Sensory cues for health and nutritional value? *Science*, 2006, vol. 311, p. 815-819.
- GOLENIOWSKI, M. E. [et al.]. Medicinal plants from the “Sierra de Comechingones”, Argentina. *Journal of Ethnopharmacology*, 2006, vol. 107, no 3, p. 324-341.
- GOLS, R. [et al.]. Induction of direct and indirect plant responses by jasmonic acid, low spider mite densities, or a combination of jasmonic acid treatment and spider mite infestation. *Journal of Chemical Ecology*, 2003, vol. 29, p. 2651-2666.
- GONDA, I. [et al.]. Branched-chain and aromatic amino acid catabolism into aroma volatiles in *Cucumis melo* L. Fruit. *Journal of Experimental Botany*, 2010, vol. 61, p. 1111-1123.
- GONG, H. Y. [et al.]. Analysis of essential oils of *Origanum vulgare* from six production areas of China and Pakistan. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 2014, vol. 24, no 1, p. 25-32.
- GONZÁLEZ ÁLVAREZ, M. [et al.]. Relationships between Godello white wine sensory properties and its aromatic fingerprinting obtained by GC-MS. *Food Chemistry*, 2011, vol. 129, p. 890-898.
- GONZALEZ, M. [et al.]. Aroma development during ripening of *Fragaria chiloensis* fruit and participation of an alcohol acyltransferase (FcAAT1) gene. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2009, vol. 57, p. 9123-9132.
- GONZÁLEZ, M. [et al.]. Análisis sensorial de aceituna de mesa: II. Aplicabilidad práctica y correlación con el análisis instrumental. *Grasas y Aceites*, 2007, vol. 58, no 3, p. 231-236.
- GONZÁLEZ, M. Á. B.; GARCIGLIA, R. S. Plantas medicinales de la Comunidad Indígena Nuevo San Juan Parangaricutiro, Michoacán, México. *Biológicas Revista de la DES Ciencias Biológico Agropecuarias Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo*, 2013, vol. 9, no 1, p. 126-138.
- GONZÁLEZ-PALOMARES, S.; RIVERA-CAMBERO, L. H.; ROSALES-REYES, T. Análisis de compuestos volátiles en cilantro (*Coriandrum sativum* L.). *Acta Universitaria*, 2010, vol. 20, no 1, p. 19-24.
- GORYNSKI, K. [et al.]. Development of SPME method for concomitant sample preparation of rocuronium bromide and tranexamic acid in plasma. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2014, vol. 92, p. 183-192.
- GOUINGUENE, S. P.; TURLINGS, T. C. J. The effects of abiotic factors on induced volatile emissions in corn plants. *Plant Physiology*, 2002, vol. 129, p. 1296-1307.
- GOVINDARAJAN, M. [et al.]. Larvicidal potential of carvacrol and terpinen-4-ol from the essential oil of *Origanum vulgare* (Lamiaceae) against *Anopheles stephensi*, *Anopheles subpictus*, *Culex quinquefasciatus* and *Culex tritaeniorhynchus* (Diptera: Culicidae). *Research in Veterinary Science*, 2016, vol. 104, p. 77-82.
- GRANERO, A. M. [et al.]. Single step determination of fragrances in *Cucurbita* flowers by coupling headspace solid-phase microextraction low-pressure gas chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 2004, vol. 1045, no 1, p. 173-179.
- GRAY, A. M.; FLATT, P. R. Insulin-releasing and insulin-like activity of the traditional anti-diabetic plant *Coriandrum sativum* (coriander). *British Journal of Nutrition*, 1999, vol. 81, no 3, p. 203-209.

- GRIGORAKIS, K. [et al.]. Volatile compounds and organoleptic qualities of gilthead sea bream (*Sparus aurata*) fed commercial diets containing different lipid sources. *Aquaculture*, 2009, vol. 290, p. 116-121.
- GROB, R. L.; BARRY, E. F. (ed.). *Modern practice of gas chromatography*. John Wiley & Sons, 2004.
- GUENTHER, A.; ZIMMERMAN, P.; WILDERMUTH, M. Natural volatile organic compound emission rate estimates for US woodland landscapes. *Atmospheric Environment*, 1994, vol. 28, no 6, p. 1197-1210.
- GUILLÉN, M. D.; IBARGOITIA, M. L. Volatile components obtained from the leaves of *Jasonia glutinosa*. *Food Chemistry*, 1996, vol. 56, no 2, p. 155-158.
- GUNAWARDENA, N. E. Steam volatiles of coconut bark: chemical investigations and electroantennogram responses of the coconut pest, *Rhynchophorus ferrugineus* (Coleoptera: Curculionidae). *Journal of the National Science Foundation of Sri Lanka*, 2017, vol. 22, no 3, p. 231-238.
- GUO, F. Q. [et al.]. Comparison of the volatile compounds of *Atractylodes* medicinal plants by headspace solid-phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 2006, vol. 570, no 1, p. 73-78.
- GUPTA, S. [et al.]. Cytotoxic evaluation of semisynthetic ester and amide derivatives of oleanolic acid. *Natural Product Communications*, 2010, vol. 5, no 10, p. 1567-1570.
- GUTIÉRREZ, D. G.; KATINAS, L. Novedades sobre la flora de San Juan II. Nuevas citas de Asteraceae, tribu Helenieae. *Hickenia*, 2003, vol. 3, no 45, p. 177-188.
- GUYTON, A. C.; HALL, J. E. *Tratado de fisiología médica*. 11 Edición. Elsevier, España, 2011.
- HADI, M. Y.; MOHAMMED, G. J.; HAMEED, I. H. Analysis of bioactive chemical compounds of *Nigella sativa* using gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Pharmacognosy and Phytotherapy*, 2016, vol. 8, no 2, p. 8-24.
- HALITSCHKE, R. [et al.]. Ecophysiological comparison of direct and indirect defenses in *Nicotiana attenuata*. *Oecologia*, 2000, vol. 124, no 3, p. 408-417.
- HAMM, S. [et al.]. Optimization of headspace solid phase microextraction for gas chromatography/mass spectrometry analysis of widely different volatility and polarity terpenoids in olibanum. *Journal of Chromatography A*, 2003, vol. 1018, no 1, p. 73-83.
- HAMMER, K. A.; CARSON, C. F.; RILEY, T. V. Antifungal activity of the components of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil. *Journal of Applied Microbiology*, 2003, vol. 95, p. 853-860.
- HANCI, S. S.; SAHIN, S.; YILMAZ, L. Isolation of volatile oil from thyme (*Thymbra spicata*) by steam distillation. *Molecular Nutrition & Food Research*, 2003, vol. 47, no 4, p. 252-255.
- HANSCH, C.; SAMMES, P. G.; TAYLOR, J. B. *Comprehensive medicinal chemistry: the rational design, mechanistic study & therapeutic applications of chemical compounds*. Pergamon Press. 1989.
- HARLEY, R. M. [et al.]. Labiatae. En: *Flowering Plants Dicotyledons*. Springer Berlin Heidelberg, 2004. p. 167-275.
- HARLEY, R. M.; PASTORE, J. F. B. A generic revision and new combinations in the *Hyptidinae* (Lamiaceae), based on molecular and morphological evidence. *Phytotaxa*, 2012, vol. 58, no 1, p. 1-55.

- HARLEY, R. M.; PAUCAR, A. Granda. List of species of tropical American *Clinopodium* (Labiatae), with new combinations. Kew Bulletin, 2000, p. 917-927.
- HASHEMI, V. H.; GHANADI, A.; SHARIF, B. Anti-inflammatory and analgesic effects of *Coriandrum sativum* L. in animal models. Journal of Shahrekord University of Medical Sciences, 2003, vol. 5, no 2, p. 8-15.
- HASSAN, F. A. S.; ALI, E. F. Impact of different water regimes based on class-A pan on growth, yield and oil content of *Coriandrum sativum* L. plant. Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences, 2014, vol. 13, no 2, p. 155-161.
- HASSAN, M. N.; ZAINAL, Z.; ISMAIL, I. Green leaf volatiles: biosynthesis, biological functions and their applications in biotechnology. Plant biotechnology journal, 2015, vol. 13, 6, p. 727-739.
- HATANAKA, A. The biogenesis of green odour by green leaves. Phytochemistry, 1993, vol. 34, p. 1201-1218.
- HAZZIT, M. [et al.]. Composition of the essential oils of *Thymus* and *Origanum* species from Algeria and their antioxidant and antimicrobial activities. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2006, vol. 54, no 17, p. 6314-6321.
- HEENAN, S. P. [et al.]. Consumer freshness perceptions of breads, biscuits and cakes. Food Quality and Preference, 2009, vol. 20, p. 380-390.
- HEIKES, D. L.; JENSEN, S. R.; FLEMING-JONES, M. E. Purge and trap extraction with GC-MS determination of volatile organic compounds in table-ready foods. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1995, vol. 43, no 11, p. 2869-2875.
- HEIL, M. Direct defense or ecological costs: Responses of herbivorous beetles to volatiles released by wild Lima bean (*Phaseolus lunatus*). Journal of Chemical Ecology, 2004, vol. 30, p. 1289-1295.
- HEIL, M. Herbivore-induced plant volatiles: targets, perception and unanswered questions. New Phytologist, 2014, vol. 204, no 2, p. 297-306.
- HEMMERLIN, A. [et al.]. Cross-talk between the cytosolic mevalonate and the plastidial methylerythritol phosphate pathways in tobacco bright yellow-2 cells. Journal of Biological Chemistry, 2003, vol. 278, p. 26666-26676.
- HERBERT, J. M. [et al.]. Verbascoside isolated from *Lantana camara*, an inhibitor of protein kinase C. Journal of Natural Products, 1991, vol. 54, no 6, p. 1595-1600.
- HERMS, D. A.; MATTSON, W. J. The dilemma of plants: to grow or defend. The Quarterly Review of Biology, 1992, vol. 67, no 3, p. 283-335.
- HERNÁNDEZ, E. Evaluación sensorial. Universidad Nacional Abierta ya Distancia-UNAD. Bogotá, Colombia. 2005.
- HERNÁNDEZ-HERNÁNDEZ, E. [et al.]. Antioxidant effect rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) and oregano (*Origanum vulgare* L.) extracts on TBARS and colour of model raw pork batters. Meat Science, 2009, vol. 81, no 2, p. 410-417.

- HILKER, M. [et al.]. Insect egg deposition induces *Pinus sylvestris* to attract egg parasitoids. *Journal of Experimental Biology*, 2002, vol. 205, p. 455-461.
- HILKER, M.; MEINERS, T. Induction of plant responses towards oviposition and feeding of herbivorous arthropods: A comparison. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 2002, vol. 104, p. 181-192.
- HILTPOLD, I. [et al.]. Systemic root signalling in a belowground, volatile-mediated tritrophic interaction. *Plant, Cell & Environment*, 2011, vol. 34, p. 1267-1275.
- HIPPELEIN, M. Analysing selected VVOCs in indoor air with solid phase microextraction (SPME): A case study. *Chemosphere*, 2006, vol. 65, no 2, p. 271-277.
- HNATYSZYN, O. [et al.]. Argentinian plant extracts with relaxant effect on the smooth muscle of the *corpus cavernosum* of Guinea pig. *Phytomedicine*, 2003, vol. 10, no 8, p. 669-674.
- HO, C. W. [et al.]. Optimization of headspace solid phase microextraction (HS-SPME) for gas chromatography mass spectrometry (GC-MS) analysis of aroma compound in palm sugar (*Arenga pinnata*). *Journal of Food Composition and Analysis*, 2006, vol. 19, no 8, p. 822-830.
- HOBALLAH, M. E. [et al.]. The composition and timing of flower odour emission by wild *Petunia axillaris* coincide with the antennal perception and nocturnal activity of the pollinator *Manduca sexta*. *Planta*, 2005, vol. 222, p. 141-150.
- HOLBROOK, M. B. Consumption experience, customer value, and subjective personal introspection: An illustrative photographic essay. *Journal of Business Research*, 2006, vol. 59, no 6, p. 714-725.
- HOLM, F.; SLINKARD, E. Coriander (*Coriander sativum* L.), Spice breeding and agronomic research. Canada-Saskatchewan Agri-Food Innovation Fund Agriculture Development Fund and Saskatchewan Herb and Spice Association, 2002, p. 5-10.
- HORIUCHI, J. I. [et al.]. Lima bean leaves exposed to herbivore-induced conspecific plant volatiles attract herbivores in addition to carnivores. *Applied Entomology and Zoology*, 2003, vpñ. 38, p. 365-368.
- HOSSEINZADEH, H.; MADANIFARD, M. Anticonvulsant effects of *Coriandrum sativum* L. seed extracts in mice. *Iranian Journal of Pharmacy*, 2005, vol. 3, p. 1-4.
- HOUGH, G. [et al.]. Number of consumers necessary for sensory acceptability tests. *Food Quality and Preference*, 2006, vol. 17, no 6, p. 522-526.
- HOYOS GARCÍA, D. [et al.]. Acumulación de grados-día en un cultivo de pepino (*Cucumis sativus* L.) en un modelo de producción aeropónico. *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín*, 2012, vol. 65, no 1, p. 6389-6398.
- HSIEH, M. H. [et al.]. Chloroplast localization of methylerythritol 4-phosphate pathway enzymes and regulation of mitochondrial genes in IspD and IspE albino mutants in Arabidopsis. *Plant Molecular Biology*, 2008, vol. 66, p. 663-673.
- HU, W. [et al.]. Consumer preferences for local production and other value-added label claims for a processed food product. *European Review of Agricultural Economics*, 2012, vol. 39, no 3, p. 489-510.

- HUANG, B. [et al.]. Comparison of headspace SPME with hydrodistillation and SFE for analysis of the volatile components of the roots of *Valeriana officinalis* var. *latifolia*. *Chromatographia*, 2009, vol. 69, no 5-6, p. 489-496.
- HUANG, M. [et al.]. The major volatile organic compound emitted from *Arabidopsis thaliana* flowers, the sesquiterpene (E)- β -caryophyllene, is a defense against a bacterial pathogen. *New Phytology*, 2012, vol. 193, p. 997-1008.
- HUIE, C. W. A review of modern sample-preparation techniques for the extraction and analysis of medicinal plants. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2002, vol. 373, no 1, p. 23-30.
- HUNG, R.; LEE, S.; BENNETT, J. W. *Arabidopsis thaliana* as a model system for testing the effect of *Trichoderma* volatile organic compounds. *Fungal Ecology*, 2013, vol. 6, no 1, p. 19-26.
- HUSSAIN, H. [et al.]. Chemistry of some species genus *Lantana*. *Pakistan Journal of Botany*, 2011, vol. 43, no 3, p. 51-62.
- HWANG, E. [et al.]. Coriander leaf extract exerts antioxidant activity and protects against UVB-induced photoaging of skin by regulation of procollagen type I and MMP-1 expression. *Journal of Medicinal Food*, 2014, vol. 17, no 9, p. 985-995.
- IANNACONE OLIVER, J. Efecto insecticida de cuatro extractos botánicos y del cartap sobre la polilla de la papa *Phthorimaea operculella* (Zeller)(Lepidoptera: Gelechiidae) y en cuatro controladores biológicos, en el Perú. *Entomotropica*, 2003, vol. 18, p. 95-105.
- IBÁÑEZ, M. A. [et al.]. Análisis gráfico mediante biplot del comportamiento de híbridos de maíz. *RIA. Revista de Investigaciones Agropecuarias*, 2006, vol. 35, no 3, p. 83-93.
- IBDAH, M. Functional characterization of *CmCCD1*, a carotenoid cleavage dioxygenase from melon. *Phytochemistry*, 2006, vol. 67, p. 1579-1589.
- IDAOMAR, M. [et al.]. Genotoxicity and antigenotoxicity of some essential oils evaluated by wing spot test of *Drosophila melanogaster*. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 2002, vol. 513, no 1, p. 61-68.
- INDURAIN, G. [et al.]. Análisis sensorial de tres tipos de carne de vacuno por un panel de consumidores. *Journal of Animal Science*, 2001, vol. 79, p. 2605-2614.
- INNOCENT, B. X. Studies on the immouostimulant activity of *Coriandrum sativum* and resistance to *Aeromonas hydrophila* in *Catla catla*. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 2011, vol. 1, p. 132-135.
- IPEK, E. [et al.]. Genotoxicity and antigenotoxicity of *Origanum* oil and carvacrol evaluated by Ames Salmonella/microsomal test. *Food Chemistry*, 2005, vol. 93, no 3, p. 551-556.
- IQBAL-BHANGER, M. [et al.]. Antioxidant potential of rice bran extracts and its effects on stabilisation of cookies under ambient storage. *International Journal of Food Science & Technology*, 2008, vol. 43, p. 779-786.
- IRAM-ISO 9001 (2008). *Sistemas de gestión de la calidad*. Segunda Edición. Suiza.
- IRERI, L. N. [et al.]. The potential of the extracts of *Tagetes minuta* Linnaeus (Asteraceae), *Acalypha fruticosa* Forssk (Euphorbiaceae) and *Tarchonanthus camphoratus* L.(Compositae) against *Phlebotomus duboscqi* Neveu

- Lemaire (Diptera: Psychodidae), the vector for *Leishmania major* Yakimoff and Schokhor. *Journal of Vector Borne Diseases*, 2010, vol. 47, no 3, p. 168-174.
- JABEEN, Q. [et al.]. Coriander fruit exhibits gut modulatory, blood pressure lowering and diuretic activities. *Journal of Ethnopharmacology*, 2009, vol. 122, no 1, p. 123-130.
- JANG, H. J.; SON, H. H.; LEE, D. S. Optimization of disk sorptive extraction based on monolithic material for the determination of aroma compounds from *Lantana camara* L. by gas chromatography-mass spectrometry. *Bulletin of the Korean Chemical Society*, 2011, vol. 32, no 12, p. 4275-4280.
- JAYANTH, K. P. [et al.]. *Parthenium* pollen induced feeding by *Zygogramma bicolorata* (Coleoptera: Chrysomelidae) on sunflower (*Helianthus annuus*) (Compositae). *Bulletin of Entomological Research*, 1993, vol. 83, p. 595-598.
- JELIĆ, H. H.; MAJCHER, M.; DZIADAS, M. Microextraction techniques in the analysis of food flavor compounds: A review. *Analytica Chimica Acta*, 2012, vol. 738, p. 13-26.
- JELIAZKOVA, E. A.; CRAKER, L. E.; ZHELJAZKOV, V. D. γ -Irradiation of Seeds and Productivity of Coriander, *Coriandrum sativum* L. *Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants*, 1998, vol. 5, no 2, p. 73-79.
- JETTER, R. Examination of the processes involved in the emission of scent volatiles from flowers. *Biology of Floral Scent*, 2006, p. 125-144.
- JIANG, C. [et al.]. Solvent-free microwave extraction coupled with headspace single-drop microextraction of essential oils from flower of *Eugenia caryophyllata* Thunb. *Journal of Separation Science*, 2010, vol. 33, no 17-18, p. 2784-2790.
- JIMENEZ-ARELLANES, A. [et al.]. Activity against multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Mexican plants used to treat respiratory diseases. *Phytotherapy Research*, 2003, vol. 17, no 8, p. 903-908.
- JONVILLE, M. C. [et al.]. Screening of medicinal plants from Reunion Island for antimalarial and cytotoxic activity. *Journal of Ethnopharmacology*, 2008, vol. 120, no 3, p. 382-386.
- JOSHI, B.; LEKHAK, S.; SHARMA, A. Antibacterial property of different medicinal plants: *Ocimum sanctum*, *Cinnamomum zeylanicum*, *Xanthoxylum armatum* and *Origanum majorana*. *Kathmandu University Journal of Science, Engineering and Technology*, 2009, vol. 5, no 1, p. 143-150.
- JOUAD, H. [et al.]. Ethnobotanical survey of medicinal plants used for the treatment of diabetes, cardiac and renal diseases in the North centre region of Morocco (Fez-Boulemane). *Journal of Ethnopharmacology*, 2001, vol. 77, No 2, p. 175-182.
- JUKIC, M. [et al.]. *In vitro* acetylcholinesterase inhibitory properties of thymol, carvacrol and their derivatives thymoquinone and thymohydroquinone. *Phytotherapy Research*, 2007, vol. 21, no 3, p. 259-261.
- JULIÃO, L. S. [et al.]. Essential oils from two *Lantana* species with antimycobacterial activity. *Natural Product Communications*, 2009, vol. 4, no 12, p. 1733-1736.
- JUMTEE, K. [et al.]. Predication of Japanese green tea (Sen-cha) ranking by volatile profiling using gas chromatography mass spectrometry and multivariate analysis. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2011, vol. 112, p. 252-255.

- JUN, Y. [et al.]. Comparison of the profile and composition of volatiles in coniferous needles according to extraction methods. *Molecules*, 2016, vol. 21, no 3, p. 363-389.
- JUNKER, R. R. [et al.]. Composition of epiphytic bacterial communities differs on petals and leaves. *Plant Biology*, 2011, vol. 13, no 6, p. 918-924.
- JÜRGENS, A.; WITT, T.; GOTTSBERGER, G. Flower scent composition in nightflowering *Silene* species (Caryophyllaceae). *Biochemical Systematics and Ecology*, 2002, vol. 30, p. 383-397.
- KALITA, S. [et al.]. A review on medicinal properties of *Lantana camara* Linn. *Research Journal of Pharmacy and Technology*, 2012, vol. 5. No 6, p. 711-715.
- KALUA, C. M. [et al.]. Olive oil volatile compounds, flavour development and quality: A critical review. *Food Chemistry*, 2007, vol. 100, p. 273-286.
- KAMINAGA, Y. [et al.]. Plant phenylacetaldehyde synthase is a bifunctional homotetrameric enzyme that catalyzes phenylalanine decarboxylation and oxidation. *Journal of Biological Chemistry*, 2006, vol. 281, p. 23357-23366.
- KAPPERS, [et al.]. Genetic engineering of terpenoid metabolism attracts bodyguards to Arabidopsis. *Science*, 2005, vol. 309, p. 2070-2072.
- KARAMI, R. [et al.]. Effects of hydroalcoholic extract of *Coriandrum sativum* on oxidative damage in pentylenetetrazole-induced seizures in rats. *Iranian Journal of Neurology*, 2015, vol. 14, no 2, p. 59-66.
- KARIMIAN, P.; KAVOOSI, G.; AMIRGHOFRA, Z. Anti-oxidative and anti-inflammatory effects of *Tagetes minuta* essential oil in activated macrophages. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2014, vol. 4, no 3, p. 219-227.
- KASALI, A. A. [et al.]. Essential Oil of *Lantana camara* L. var. *aculeata* from Nigeria. *Journal of Essential Oil Research*, 2004, vol. 16, no 6, p. 582-584.
- KATAOKA, H.; LORD, H. L.; PAWLISZYN, J. Applications of solid-phase microextraction in food analysis. *Journal of Chromatography A*, 2000, vol. 880, no 1, p. 35-62.
- KATHURIA, V.; KAUSHIK, N. Evaluation of insecticidal property of some plant species against *Helicoverpa armigera*. *Indian Journal of Agricultural Science*, 2006, vol. 76, no 10, p. 614-617.
- KAWAGUCHI, M. [et al.]. Applications of stir-bar sorptive extraction to food analysis. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2013, vol. 45, p. 280-293.
- KEGGE, W. [et al.]. Red: far-red light conditions affect the emission of volatile organic compounds from barley (*Hordeum vulgare*), leading to altered biomass allocation in neighbouring plants. *Annals of Botany*, 2015, vol. 115, no 6, p. 961-970.
- KENNEDY, G. G.; FARRAR, R. R.; KASHYAP, R. K. 2-Tridecanone – glandular trichome-mediated insect resistance in tomato. In: Hedin, P.A. (Ed.), *Naturally Occurring Pest Bioregulators*. (ACS Symposium Series 449). American Chemical Society, Washington DC, 1991, p. 150-165.
- KESSLER, A.; BALDWIN, I. T. Defensive function of herbivore-induced plant volatile emissions in nature. *Science*, 2001, vol. 291, p. 2142-2143.

- KESSLER, A.; HALITSCHKE, R. Specificity and complexity: the impact of herbivore-induced plant responses on arthropod community structure. *Current Opinion of Plant Biology*, 2007, vol. 10, p. 409-414.
- KESSLER, A. [et al.]. Priming of plant defense responses in nature by airborne signaling between *Artemisia tridentata* and *Nicotiana attenuata*. *Oecologia*, 2006, vol. 148, no 2, p. 280-292.
- KESSLER, A.; HALITSCHKE, R.; POVEDA, K. Herbivory-mediated pollinator limitation: negative impacts of induced volatiles on plant–pollinator interactions. *Ecology*, 2011, vol. 92, no 9, p. 1769-1780.
- KESSLER, A.; HEIL, M. The multiple faces of indirect defences and their agents of natural selection. *Functional Ecology*, 2011, vol. 25, p. 348-357.
- KHAN, M. I. R. [et al.]. Modulation and significance of nitrogen and sulfur metabolism in cadmium challenged plants. *Plant Growth Regulation*, 2016, vol. 78, no 1, p. 1-11.
- KHODAKOVSKAYA, M. V. [et al.]. Carbon nanotubes as plant growth regulators: effects on tomato growth, reproductive system, and soil microbial community. *Small*, 2013, vol. 9, no 1, p. 115-123.
- KINNAMON, S. C. Umami taste transduction mechanisms. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 2009, vol. 90, no. 3, p. 753S-755S.
- KINSLER, L. E. [et al.]. *Fundamentals of Acoustics*, 4th Edition. Wiley & Son. New York. USA. 1999.
- KNOBLOCH, K. [et al.]. Antibacterial and antifungal properties of essential oil components. *Journal of Essential Oil Research*, 1989, vol. 1, p. 119-128.
- KNUDSEN, J. T.; GERSHENZON, J. The chemical diversity of floral scent. En: *Biology of floral scent*, Dudareva, N. and Pichersky, E., Eds., CRC Press, Boca Raton, FL, USA, 2006, p. 27-52.
- KOEDUKA, T. [et al.]. Eugenol and isoeugenol, characteristic aromatic constituents of spices, are biosynthesized via reduction of a coniferyl alcohol ester. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2006, vol. 103, p. 10128-10133.
- KOHLI, R. K. [et al.]. Status, invasiveness and environmental threats of three tropical American invasive weeds (*Parthenium hysterophorus* L., *Ageratum conyzoides* L., *Lantana camara* L.) in India. *Biological Invasions*, 2006, vol. 8, no 7, p. 1501-1510.
- KOKOSA, J. M. Advances in solvent-microextraction techniques. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2013, vol. 43, p. 2-13.
- KOLB, B.; ETTRE, L. S. *Static headspace-gas chromatography: theory and practice*. John Wiley & Sons. 2006.
- KONG, C. H. [et al.]. Herbicidal potential of allelochemicals from *Lantana camara* against *Eichhornia crassipes* and the alga *Microcystis aeruginosa*. *Weed Research*, 2006, vol. 46, no 4, p. 290-295.
- KORDALI, S. [et al.]. Antifungal, phytotoxic and insecticidal properties of essential oil isolated from Turkish *Origanum acutidens* and its three components, carvacrol, thymol and p-cymene. *Bioresource Technology*, 2008, vol. 99, no 18, p. 8788-8795.
- KOSMA, D. K. [et al.]. The impact of water deficiency on leaf cuticle lipids of Arabidopsis. *Plant Physiology*, 2009, vol. 151, no 4, p. 1918-1929.

- KOVACEVIC, N. N. [et al.]. Composition of the essential oils of different parts of *Seseli annuum* L.(Apiaceae). Journal of Essential Oil Bearing Plants, 2016, vol. 19, no 3, p. 671-677.
- KOZIEL, J. [et al.]. Field air analysis with SPME device. Analytica Chimica Acta, 1999, vol. 400, no 1, p. 153-162.
- KRAMER, A. Glossary of some terms used in the sensory (panel) evaluation of foods and beverages. Food Technology, 1959, vol. 13, p. 733-738.
- KRAUJALYTĖ, V.; LEITNER, E.; VENSKUTONIS, P. R. Characterization of *Aronia melanocarpa* volatiles by headspace-solid-phase microextraction (HS-SPME), simultaneous distillation/extraction (SDE), and gas chromatography-olfactometry (GC-O) methods. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2013, vol. 61, no 20, p. 4728-4736.
- KRIKORIAN, A. D. Medios de cultivo: generalidades, composición y preparación. Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones. Cali: CIAT, 1991, p. 41-77.
- KRISHNARAJU, A. V. [et al.]. Assessment of bioactivity of Indian medicinal plants using brine shrimp (*Artemia salina*) lethality assay. International Journal of Applied Science and Engineering, 2005, vol. 3, no 2, p. 125-134.
- KUBO, I. [et al.]. Antibacterial activity of coriander volatile compounds against *Salmonella choleraesuis*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2004, vol. 52, no 11, p. 3329-3332.
- KUBO, I.; MUROI, H.; KUBO, A. Structural functions of antimicrobial long-chain alcohols and phenols. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 1995, vol. 3, p. 873-880.
- KUHN, U. [et al.]. Seasonal differences in isoprene and light-dependent monoterpene emission by *Amazonian* tree species. Global Change Biology, 2004, vol. 10, no 5, p. 663-682.
- KULISIC, T. [et al.]. Use of different methods for testing antioxidative activity of oregano essential oil. Food Chemistry, 2004, vol. 85, no 4, p. 633-640.
- KUMAR, M. S.; MANEEMEGALAI, S. Evaluation of larvicidal effect of *Lantana camara* Linn against mosquito species *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus*. Advances in Biological Research, 2008, vol. 2, no 3-4, p. 39-43.
- KUNERT, G. [et al.]. Alarm pheromone mediates production of winged dispersal morphs in aphids. Ecology Letters, 2005, vol. 8, no 6, p. 596-603.
- KUNERT, M. [et al.]. Volatile sampling from biological sources by the closed-loop-stripping technique. Cold Spring Harbor Protocols, 2009, vol. 2009, no 6, p. pdb. prot5233.
- KUNZE, J.; GUMBERT, A. The combined effect of colour and odor on flower choice behavior of bumble bees in flower mimicry systems. Behavioral Ecology, 2001, vol. 12, p. 447-456.
- LAL, A. [et al.]. Hypolipidemic effect of *Coriandrum sativum* L. in triton-induced hyperlipidemic rats, Journal of Experimental Biology, 2004, vol. 42, no 9, p. 909-912.

- LAMBRECHT GONÇALVES, C. [et al.]. Actividad antibacteriana de los extractos de *Cymbopogon citratus*, *Elionurus* sp. y *Tagetes minuta* contra bacterias que causan mastitis. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 2013, vol. 18, no 3, p. 487-494.
- LARIBI, B. [et al.]. Coriander (*Coriandrum sativum* L.) and its bioactive constituents. *Fitoterapia*, 2015, vol. 103, p. 9-26.
- LAULE, O. [et al.]. Crosstalk between cytosolic and plastidial pathways of isoprenoid biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, 2003, vol. 100, no 11, p. 6866-6871.
- LAWLESS, H. T.; HEYMANN, H. Sensory evaluation of food: principles and practices. Springer Science & Business Media, New York. USA, 2010.
- LEE, H. J.; YUN, Z. S. Consumers' perceptions of organic food attributes and cognitive and affective attitudes as determinants of their purchase intentions toward organic food. *Food Quality and Preference*, 2015, vol. 39, no 2015, p. 259–267.
- LENARDIS, A. E.; GIL, A.; MORVILLO, C. Orégano. En: De la Fuente EB, Gil A, Jiménez PI, Kantolic AG, Lopez Pereira M, Ploschuk EL, Sorlino DM, Vilariño MP, Warsner DF, Windaver LB (Eds.). *Cultivos Industriales*. Ed. Facultad de Agronomía, Buenos Aires. Argentina. 2006.
- Li ZG, Lee MR, Shen DL (2006). Analysis of volatile compounds emitted from fresh *Syringa oblata* flowers in different florescence by Headspace Solid-Phase Microextraction/Gas Chromatography-Mass Spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 576(1), 43-49.
- LIMA, B. [et al.]. Essential Oils of Medicinal Plants from the Central Andes of Argentina: Chemical Composition, and Antifungal, Antibacterial, and Insect-Repellent Activities. *Chemistry & Biodiversity*, 2011, vol. 8, no 5, p. 924-936.
- LIN, J. [et al.]. Volatile profile analysis and quality prediction of Longjing tea (*Camellia sinensis*) by HS-SPME/GC-MS. *Journal of Zhejiang University Science B*, 2012, vol. 13, p. 972-980.
- LIN, L. [et al.]. GC/MS analysis of volatiles obtained by headspace solid-phase microextraction and simultaneous–distillation extraction from *Rabdosia serra* (MAXIM.) HARA leaf and stem. *Food Chemistry*, 2013, vol. 136, no 2, p. 555-562.
- LINARES LUJÁN, G. [et al.]. Efecto de las diferentes proporciones de pulpa de frutas cítricas en la aceptabilidad sensorial de una bebida fermentada y proteica elaborada a partir de lactosuero residual. *Agroindustrial Science*, 2015, vol. 4. No 2, p. 65-73.
- LITAUDON, M. [et al.]. Cytotoxic pentacyclic triterpenoids from *Combretum sundaicum* and *Lantana camara* as inhibitors of Bcl-xL/BakBH3 domain peptide interaction. *Journal of Natural Products*, 2009, vol. 72, no 7, p. 1314-1320.
- LLOYD, G.; MCCOWN, B. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. *Combined Proceedings, International Plant Propagators Society*, 1980, vol. 30, p. 421-427.

- LO CANTORE, P. [et al.]. Antibacterial activity of *Coriandrum sativum* L. and *Foeniculum vulgare* Miller var. *vulgare* (Miller) essential oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2004, vol. 52, no 26, p. 7862-7866.
- LONG, M. C. [et al.]. Involvement of snapdragon benzaldehyde dehydrogenase in benzoic acid biosynthesis. *Plant Journal*, 2009, vol. 59, p. 256-265.
- LÓPEZ, M. L.; BONZANI, N. E.; ZYGADLO, J. A. Allelopathic potential of *Tagetes minuta* terpenes by a chemical, anatomical and phytotoxic approach. *Biochemical Systematics and Ecology*, 2008, vol. 36, no 12, p. 882-890.
- LÓPEZ, S. B. [et al.]. Composition and anti-insect activity of essential oils from *Tagetes* L. species (Asteraceae, Helenieae) on *Ceratitis capitata* Wiedemann and *Triatoma infestans* Klug. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2011, vol. 59, no 10, p. 5286-5292.
- LORD, H.; PAWLISZYN, J. Evolution of solid-phase microextraction technology. *Journal of Chromatography A*, 2000, vol. 885, no 1, p. 153-193.
- LORETO, F. [et al.]. Incomplete ¹³C labelling of α -pinene content of *Quercus ilex* leaves and appearance of unlabelled C in α -pinene emission in the dark. *Plant, Cell & Environment*, 2000, vol. 23, no 2, p. 229-234.
- LORETO, F. [et al.]. Ozone quenching properties of isoprene and its antioxidant role in leaves. *Plant Physiology*, 2001, vol. 126, p. 993-1000.
- LORETO, F. [et al.]. Impact of ozone on monoterpene emissions and evidence for an isoprene-like antioxidant action of monoterpenes emitted by *Quercus ilex* leaves. *Tree Physiology*, 2004, vol. 24, p. 361-367.
- LORETO, F.; VELIKOVA, V. Isoprene produced by leaves protects the photosynthetic apparatus against ozone damage, quenches ozone products, and reduces lipid peroxidation of cellular membranes. *Plant Physiology*, 2001, vol. 127, p. 781-1787.
- LOUGHRIN, J. H. [et al.]. Diurnal cycle of emission of induced volatile terpenoids herbivore injured cotton plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1994, vol. 91, p. 11836-11840.
- LOZANO, P. R. Characterizing aroma-active volatile compounds of tropical fruits. En: Marsili R (Ed). *Flavor, Fragrance, and Odor Analysis*, CRC Press, USA. 2016, Cap. 6, p. 111-134.
- LUCAS-BARBOSA, D.; VAN LOON, J.; DICKE, M. The effects of herbivore-induced plant volatiles on interactions between plants and flower-visiting insects. *Phytochemistry*, 2011, vol. 72, p. 1647-1654.
- LUCCHESI, M. E. [et al.]. Solvent free microwave extraction of *Elletaria cardamomum* L.: A multivariate study of a new technique for the extraction of essential oil. *Journal of Food Engineering*, 2007, vol. 79, no 3, p. 1079-1086.
- LUFT, S.; CURIO, E.; TACUD, B. The use of olfaction in the foraging behaviour of the golden-mantled flying fox, *Pteropus pumilus*, and the greater musky fruit bat, *Ptenochirus jagori* (Megachiroptera: Pteropodidae). *Naturwiss*, 2003, vol. 90, p. 84-87.
- LUKAS, B.; SCHMIDERER, C.; NOVAK, J. Essential oil diversity of European *Origanum vulgare* L. (Lamiaceae). *Phytochemistry*, 2015, vol. 119, p. 32-40.

- LUNA, L. [et al.]. Chemical composition and antibacterial activity of *Satureja parvifolia* (Phil.) Epling essential oil. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 2008, vol. 11, no 1, p. 106-111.
- LV, H. P. [et al.]. Aroma characterisation of Pu-erh tea using headspace-solid phase microextraction combined with GC/MS and GC-olfactometry. *Food Chemistry*, 2012, vol. 130, p. 1074-1081.
- LV, S. D. [et al.]. Multivariate Analysis Based on GC-MS Fingerprint and Volatile Composition for the Quality Evaluation of Pu-Erh Green Tea. *Food Analytical Methods*, 2015, vol. 8, no 2, p. 321-333.
- MA, Q. L. [et al.]. Optimization of headspace solid phase microextraction (HS-SPME) for gas chromatography mass spectrometry (GC-MS) analysis of aroma compounds in cooked beef using response surface methodology. *Microchemical Journal*, 2013, vol. 111, p. 16-24.
- MADYASTHA, K. M.; THULASIRAM, H. V. Transformation of a monoterpene ketone, (R)-(+)-pulegone, a potent hepatotoxin, in *Mucor piriformis*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1999, vol. 47, no 3, p. 1203-1207.
- MAESTRI, D. M. [et al.]. Composición del aceite esencial en poblaciones argentinas de *Tagetes filifolia* Lag. (Compositae). *Anales de Biología de la Universidad de Murcia - Biología Vegetal*, 1991, vol. 17, p. 133-136.
- MAGGI, E. Hierbas aromáticas y especias, Informe de coyuntura mensual-octubre 2008. Dirección Nacional de Alimentos, Dirección de Industria Alimentaria, SAGPyA, 2008, p. 3-5. Disponible en: http://www.alimentosargentinos.gov.ar/0-3/especias/02_Informes/IM_OCT08
- MAHADY, G. B. Medicinal plants for the prevention and treatment of bacterial infections. *Current Pharmaceutical Design*, 2005, vol. 11, no 19, p. 2405-2427.
- MAHENDRA, P.; BISHT, S. Anti-anxiety activity of *Coriandrum sativum* assessed using different experimental anxiety models. *Indian Journal of Pharmacology*, 2011, vol. 43, no 5, p. 574-577.
- MAIA, R. [et al.]. Optimization of HS-SPME analytical conditions using factorial design for trihalomethanes determination in swimming pool water samples. *Microchemical Journal*, 2014, vol. 112, p. 164-171.
- MALDONADO, E. M. [et al.]. Antileishmanial metabolites from *Lantana balansae*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 2016, vol. 26, no 2, p. 180-183.
- MALDONADO, I. B. [et al.]. Determinación del tiempo termal en la aparición de hojas de híbridos de girasol en Chaco. Cátedra de Agroclimatología, Facultad de Ciencias Agrarias, UNNE. Argentina. 2006.
- MALUF, W. R. [et al.]. 2-Tridecanone-mediated mechanisms of resistance to the South American tomato pinworm *Scrobipalpus absoluta* (Meyrick, 1917) (Lepidoptera-Gelechiidae) in *Lycopersicon* spp. *Euphytica*, 1997, vol. 93, p. 189-194.
- MANCINI, E. [et al.]. Chemical composition and biological activity of the essential oil of *Origanum vulgare* ssp. *hirtum* from different areas in the Southern Apennines (Italy). *Chemistry & Biodiversity*, 2014, vol. 11, no 4, p. 639-651.
- MANDAL, V.; MOHAN, Y.; HEMALATHA, S. Microwave assisted extraction-an innovative and promising extraction tool for medicinal plant research. *Pharmacognosy Reviews*, 2007, vol. 1, no 1, p. 7-18.

- MANI, V. [et al.]. Reversal of memory deficits by *Coriandrum sativum* leaves in mice. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2011, vol. 91, no 1, p. 186-192.
- MARANGONI, C.; DE MOURA, N. F. Antioxidant activity of essential oil from *Coriandrum Sativum* L. in Italian salami. Food Science and Technology (Campinas), 2011, vol. 31, p. 124-128.
- MARÍN-LOAIZA, J. C.; CÉSPEDES, C. L. Compuestos volátiles de plantas. Origen, emisión, efectos, análisis y aplicaciones en el agro. Revista Fitotecnia Mexicana, 2007, vol. 30, no 4, p. 327-351. Disponible en: <http://www.redalyc.org>
- MAROTTI, M. [et al.]. Characterization and yield evaluation of essential oils from different *Tagetes* species. Journal of Essential Oil Research, 2004, vol. 16. No 5, p. 440-444.
- MAROUFI, K.; FARAHANI, H. A.; DARVISHI, H. H. Importance of coriander (*Coriandrum sativum* L.) between the medicinal and aromatic plants. Advances in Environmental Biology, 2010, vol. 4, no 3, p. 433-436.
- MARTÍNEZ, G. J. Cultural patterns of firewood use as a tool for conservation: A study of multiple perceptions in a semiarid region of Cordoba, Central Argentina. Journal of Arid Environments, 2015, vol. 121, p. 84-99.
- MARTÍNEZ, G. J.; CÚNEO, P. Las denominaciones vernáculas y el conocimiento toba del entorno vegetal. Revista de Dialectología y Tradiciones Populares, 2009, vol. 64, no 2, p. 149-168.
- MARTÍNEZ, G. J. [et al.]. A numeric index to establish conservation priorities for medicinal plants in the Paravachasca Valley, Córdoba, Argentina. En Human Exploitation and Biodiversity Conservation. Springer Netherlands, 2005. p. 117-135.
- MARTÍNEZ-GORDILLO, M. [et al.]. Géneros de Lamiaceae de México, diversidad y endemismo. Revista Mexicana de Biodiversidad, 2013, vol. 84, no 1, p. 30-86.
- MARTINS, N. [et al.]. Decoction, infusion and hydroalcoholic extract of *Origanum vulgare* L.: different performances regarding bioactivity and phenolic compounds. Food Chemistry, 2014, vol. 158, p. 73-80.
- MATASYOH, J. C. [et al.]. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Coriandrum sativum*. Food Chemistry, 2009, vol. 113, no 2, p. 526-529.
- MAYEE, R.; THOSAR, A. Evaluation of *Lantana camara* Linn. (Verbenaceae) for antiurolithiatic and antioxidant activities in rats. International Journal of Pharmaceutical and Clinical Research, 2011, vol. 3, no 1, p. 10-14.
- MAZIDA, M. M.; SALLEH, M. M.; OSMAN, H. Analysis of volatile aroma compounds of fresh chilli (*Capsicum annum*) during stages of maturity using solid phase microextraction (SPME). Journal of Food Composition and Analysis, 2005, vol. 18, no 5, p. 427-437.
- MCCALL, A. C.; IRWIN, R. E. Florivory: the intersection of pollination and herbivory. Ecology Letters, 2006, vol. 9, p. 1351-1365.
- MCFARLANE, H. E. [et al.]. Golgi-and trans-Golgi network-mediated vesicle trafficking is required for wax secretion from epidermal cells. Plant Physiology, 2014, vol. 164, no 3, p. 1250-1260.
- MCGARVEY, D. J.; CROTEAU, R. Terpenoid metabolism. Plant Cell, 1995, vol. 7, p. 1015-1026.

- MEDHIN, D. G.; BAKOS, P.; HADHÁZY, P. Inhibitory effects of extracts of *Lupinus termis* and *Coriandrum sativum* on electrically induced contraction of the rabbit ear artery. *Acta Pharmaceutica Hungarica*, 1986a, vol. 56, no 3, p. 109-113.
- MEDHIN, D. G. [et al.]. Hypotensive effects of *Lupinus termis* and *Coriandrum sativum* in anesthetized rats: preliminary study. *Acta Pharmaceutica Hungarica*, 1986b, vol. 56, no 2, p. 59-63.
- MEENA, M. R.; SETHI, V. Antimicrobial activity of essential oils from spices. *Journal of Food and Science Technology*, 1994, vol. 31, no 1, p. 68-70.
- MEHRSHAHI, P.; JOHNNY, C.; DELLAPENNA, D. Redefining the metabolic continuity of chloroplasts and ER. *Trends in Plant Science*, 2014, vol. 19, no 8, p. 501-507.
- MEILGAARD, M. C.; CIVILLE, G. V.; CARR, B. T. *Sensory Evaluation Techniques*. 4^o edición. CRC Press. Florida. USA. 2007.
- MEJRI, J.; ABDERRABBA, M.; MEJRI, M. Chemical composition of the essential oil of *Ruta chalepensis* L.: Influence of drying, hydro-distillation duration and plant parts. *Industrial Crops and Products*, 2010, vol. 32, no 3, p. 671-673.
- MELLO, F. B. [et al.]. Effects of *Lantana camara* (Verbenaceae) on general reproductive performance and teratology in rats. *Toxicol*, 2005, vol. 45, no 4, p. 459-466.
- MELLO, F. B. [et al.]. Effects of *Lantana camara* (Verbenaceae) on rat fertility. *Veterinary and Human Toxicology*, 2003, vol. 45, no 1, p. 20-23.
- MERIB, J. [et al.]. Simultaneous determination of trihalomethanes and organochlorine pesticides in water samples by direct immersion-headspace-solid phase microextraction. *Journal of Chromatography A*, 2013, vol. 1321, p. 30-37.
- MERKLE, S.; KLEEBERG, K. K.; FRITSCH, J. Recent developments and applications of solid phase microextraction (SPME) in food and environmental analysis. A review. *Chromatography*, 2015, vol. 2, no 3, p. 293-381.
- MESHKATASADAT, M. H. [et al.]. Chemical characterization of volatile components of *Tagetes minuta* L. cultivated in south west of Iran by nano scale injection. *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures*, 2010, vol. 5, no 1, p. 101-106.
- MESZ, B.; TREVISAN, M. A.; SIGMAN, M. The taste of music. *Perception*, 2011, vol. 40, no 2, p. 209-219.
- MEZZOUG. N. [et al.]. Investigation of the mutagenic and antimutagenic effects of *Origanum compactum* essential oil and some of its constituents. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 2007, vol. 629, no 2, p. 100-110.
- MICHALCZYK, M. [et al.]. Effect of adding essential oils of coriander (*Coriandrum sativum* L.) and hyssop (*Hyssopus officinalis* L.) on the shelf life of ground beef. *Meat Science*, 2012, vol. 90, no 3, p. 842-850.
- MILLER, A. B. [et al.]. The antibacterial and antifungal activity of essential oils extracted from Guatemalan medicinal plants. *Pharmaceutical Biology*, 2015, vol. 53, no 4, p. 548-554.

- MIRHOSSEINI, H. [et al.]. Solid-phase microextraction for headspace analysis of key volatile compounds in orange beverage emulsion. *Food Chemistry*, 2007, vol. 105, no 4, p. 1659-1670.
- MISHARINA, T. A. Influence of the duration and conditions of storage on the composition of the essential oil from coriander seeds. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 2001, vol. 37, no 6, p. 622-628.
- MISRA, N. [et al.]. Chemical constituents and antifilarial activity of *Lantana camara* against human lymphatic filariid *Brugia malayi* and rodent filariid *Acanthocheilonema viteae* maintained in rodent hosts. *Parasitology Research*, 2007, vol. 100, no 3, p. 439-448.
- MOGHADDAM, M.; OMIDBIAGI, R.; SEFIDKON, F. Changes in content and chemical composition of *Tagetes minuta* oil at various harvest times. *Journal of Essential Oil Research*, 2007, vol. 19, no 1, p. 18-20.
- MOHAMMADHOSSEINI, M.; MAHDAVI, B.; AKHLAGHI, H. Characterization and chemical composition of the volatile oils from aerial parts of *Eryngium bungei* Bioss. (Apiaceae) by using traditional hydrodistillation, microwave assisted hydrodistillation and head space solid phase microextraction methods prior to GC and GC/MS analyses: A comparative approach. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 2013, vol. 16, no 5, p. 613-623.
- MOHAMMADHOSSEINI, M.; NEKOEI, M. Chemical compositions of the essential oils and volatile compounds from the aerial parts of *Ferula ovina* using hydrodistillation, MAHD, SFME and HS-SPME methods. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 2014, vol. 17, no 5, p. 747-757.
- MOLINA, A. [et al.]. Composición de volátiles de *Satureja parvifolia* y *S. odora* del centro de Argentina. En: Congreso Latinoamericano de Fitoquímica. 1. Reunión de la Sociedad Latinoamericana de Fitoquímica. 4. Mayo. Buenos Aires. Argentina. 2010.
- MOLNAR, P. J. A model for overall description of food quality. *Food Quality and Preference*, 1995, vol. 6, p. 185-190.
- MONGELLI, E. [et al.]. The potential effects of allelopathic mechanisms on plant species diversity and distribution determined by the wheat rootlet growth inhibition bioassay in South American plants. *Revista Chilena de Historia Natural*, 1997, vol. 70, no 1, p. 83-89.
- MONGELLI, E. [et al.]. Screening of Argentine medicinal plants using the brine shrimp microwell cytotoxicity assay. *International Journal of Pharmacognosy*, 1996, vol. 34, no 4, p. 249-254.
- MONIRUZZAMAN, M. [et al.]. Effect of sowing dates and genotypes on the yield of coriander (*Coriandrum sativum* L.). *Bangladesh Journal of Agricultural Research*, 2015, vol. 40, no 1, p. 109-119.
- MONTEIRO, M. [et al.]. Analysis of volatile human urinary metabolome by solid-phase microextraction in combination with gas chromatography–mass spectrometry for biomarker discovery: Application in a pilot study to discriminate patients with renal cell carcinoma. *European Journal of Cancer*, 2014, vol. 50, no 11, p. 1993-2002.
- MOOSAVI, S. G. R. Yield and yield components of *Coriandrum sativum* L. as affected sowing date and plant density. *Technical Journal of Engineering and Applied Sciences*, 2012, vol. 2, no 4, p. 88-92.

- MORADALIZADEH, M. [et al.]. Chemical constituents of the essential oils from the leaves, flowers and seeds of *Tagetes minuta* L. by GC/MS. International Journal of Advanced Biological and Biomedical Research, 2013, vol. 1, no 9, p. 1124-1128.
- MORADI, M. [et al.]. Phytochemical and antibacterial properties of *Origanum vulgare* ssp. *gracile* growing wild in Kurdistan province of Iran. Journal of Food Quality and Hazards Control, 2014, vol. 1, no 4, p. 120-124.
- MORTON, J. F. *Lantana*, or red sage (*Lantana camara* L., Verbenaceae), notorious weed and popular garden follower: some case of poisoning in Florida. Economic Botany, 1994, vol. 48, p. 259-270.
- MOSKOWITZ, H. R. Sensory analysis procedures and viewpoints: Intellectual history, current debates, future outlooks. Journal of Sensory Studies, 1993, vol. 8, no 3, p. 241-256.
- MSAADA, K. [et al.]. Regional and maturational effects on essential oils yields and composition of coriander (*Coriandrum sativum* L.) fruits. Scientia Horticulturae, 2009, vol. 122, p. 116-124.
- MSAADA, K. [et al.]. Changes on essential oil composition of coriander (*Coriandrum sativum* L.) fruits during three stages of maturity. Food Chemistry, 2007, vol. 102, p. 1131-1134.
- MUHLEMANN, J. K.; KLEMPIEN, A.; DUDAREVA, N. Floral volatiles: from biosynthesis to function. Plant, Cell & Environment, 2014, vol. 37, no 8, p. 1936-1949.
- MUNIR, A. A. A taxonomic review of *Lantana camara* L. and *L. montevidensis* (Spreng.) Briq. (Verbenaceae) in Australia. Journal of the Adelaide Botanic Garden, 1996, p. 1-27.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum, 1962, vol. 15, p. 473-97.
- MURPHY, S. D. Pollen allelopathy. In: Inderjit, Dakshini, K.M.M., Foy, C.L. (Eds.), Principles and Practices in Plant Ecology: Allelochemical Interactions. CRC Press, Boca Raton, FL, USA, 1999, p. 129-148.
- MUSCHIETTI, L. [et al.]. Chemical composition of the leaf oil of *Satureja odora* and *Satureja parvifolia*. Journal of Essential Oil Research, 1996, vol. 8, no 6, p. 681-684.
- MUSELLI, A. [et al.]. Volatile constituents of *Achillea ligustica* All. by HS-SPME/GC/GC-MS. Comparison with essential oils obtained by hydrodistillation from *Corsica* and *Sardinia*. Chromatographia, 2009, vol. 69, no 5-6, p. 575-585.
- NABETA, K. [et al.]. Synthesis of chlorophyll a and β -carotene from 2H- and 13C-labelled mevalonates and 13C-labelled glycine in cultured cells of liverworts, *Heteroscyphus planus* and *Lophocolea heterophylla*. Journal of the Chemical Society-Perkin Transactions, 1997, vol. 1, p. 261-267.
- NADEEM, M. [et al.]. Nutritional and medicinal aspects of coriander (*Coriandrum sativum* L.). British Food Journal, 2013, vol. 115, no 5, p. 743-755.
- NÆS, T.; BROCKHOFF, P. B.; TOMIC, O. Quality control of sensory profile data. Statistics for sensory and consumer science, John Wiley & Sons Ltd., 2010, p. 11-38.
- NAIR, V.; SINGH, S.; GUPTA, Y. K. Anti-granuloma activity of *Coriandrum sativum* in experimental models. Journal of Ayurveda and Integrative Medicine, 2013, vol. 4, no 1, p. 13-18.

- NAKABAYASHI, R.; SAITO, K. Integrated metabolomics for abiotic stress responses in plants. *Current Opinion in Plant Biology*, 2015, vol. 24, p. 10-16.
- NAKAMURA, A. [et al.]. Two distinct isopentenyl diphosphate isomerases in cytosol and plastid are differentially induced by environmental stresses in tobacco. *FEBS Letters*, 2001, vol. 506, p. 61–64.
- NANASOMBAT, S.; LOHASUPTHAWEE, P. Antibacterial activity of crude ethanolic extracts and essential oils of spices against salmonellae and other enterobacteria. *Kmitl Science and Technology Journal*, 2005, vol. 5, no 3, p. 527-538.
- NANDITHA, B. R.; JENA, B. S.; PARABHASANKAR, P. Influence of natural antioxidants and their carry through property in biscuit processing. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2008, vol. 89, p. 288-298.
- NATIONAL INSTITUTE OF STANDARDS AND TECHNOLOGY (NIST) Disponible en: <http://webbook.nist.gov/chemistry/>
- NAYAK, B. S. [et al.]. Evaluation of wound healing activity of *Lantana camara* L. A preclinical study. *Phytotherapy Research*, 2009, vol. 23, no 2, p. 241-245.
- NAZERUDDIN, G. M. [et al.]. *Coriandrum sativum* seed extract assisted in situ green synthesis of silver nanoparticle and its anti-microbial activity. *Industrial Crops and Products*, 2014, vol. 60, p. 212-216.
- NEFFATI, M.; MARZOUK, B. Changes in essential oil and fatty acid composition in coriander (*Coriandrum sativum* L.) leaves under saline conditions. *Industrial Crops and Products*, 2008, vol. 28, p. 137-142.
- NEFFATI, M.; MARZOUK, B. Roots volatiles and fatty acids of coriander (*Coriandrum sativum* L.) grown in saline medium. *Acta Physiologiae Plantarum*, 2009, vol. 31, p. 455-461.
- NEJAD EBRAHIMI, S.; HADIAN, J.; RANJBAR, H. Essential oil compositions of different accessions of *Coriandrum sativum* L. from Iran. *Natural Product Research*, 2010, vol. 24, no 14, p. 1287-1294.
- NEKOEI, M.; MOHAMMADHOSSEINI, M. Chemical Compositions of the Essential Oils from the Aerial Parts of *Achillea wilhelmsii* Using Traditional Hydrodistillation, Microwave Assisted Hydro-distillation and Solvent-Free Microwave Extraction Methods: Comparison with the Volatile Compounds Obtained by Headspace Solid-Phase Microextraction. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 2016, vol. 19, no 1, p. 59-75.
- NELDER, J. A. The statistics of linear models: back to basics. *Statistics and Computing*, 1994, vol. 4, no 4, p. 221-234.
- NEMATY, M. [et al.]. The effect of hydroalcoholic extract of *Coriandrum sativum* on rat appetite. *Avicenna Journal of Phytomedicine*, 2013, vol. 3, no 1, p. 91-97.
- NERÍN, C. [et al.]. Critical review on recent developments in solventless techniques for extraction of analytes. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2009, vol. 393, no 3, p. 809-833.
- NEVEU N. [et al.]. Systemic release of herbivore-induced plant volatiles by turnips infested by concealed root-feeding larvae *Delia radicum* L. *Journal of Chemical Ecology*, 2002, vol. 28, p. 1717-1732.
- NGASSOUM, M. B. [et al.]. Chemical composition of essential oils of *Lantana camara* leaves and flowers from Cameroon and Madagascar. *Flavour and Fragrance Journal*, 1999, vol. 14, no 4, p. 245-250.

- NICKAVAR, B.; MOJAB, F. Hydrodistilled volatile constituents of *Calamintha officinalis* Moench from Iran. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 2005, vol. 8, no 1, p. 23-27.
- NIINEMETS, Ü.; KÄNNASTE, A.; COPOLOVICI, L. Quantitative patterns between plant volatile emissions induced by biotic stresses and the degree of damage. *Frontiers in Plant Science*, 2013, vol. 4, no 262, p. 1-15.
- NIINEMETS, Ü.; LORETO, F.; REICHSTEIN, M. Physiological and physicochemical controls on foliar volatile organic compound emissions. *Trends in Plant Science*, 2004, vol. 9, no 4, p. 180-186.
- NIINEMETS, Ü. [et al.]. The leaf-level emission factor of volatile isoprenoids: caveats, model algorithms, response shapes and scaling. *Biogeosciences*, 2010, vol. 7, no 6, p. 1809.
- NIINEMETS, Ü.; REICHSTEIN, M. Controls on the emission of plant volatiles through stomata: a sensitivity analysis. *Journal of Geophysical Research: Atmospheres*, 2003, vol. 108, no D7-4211, p. 1-17.
- NIINEMETS, Ü. [et al.]. A model coupling foliar monoterpene emissions to leaf photosynthetic characteristics in Mediterranean evergreen *Quercus* species. *New Phytologist*, 2002, vol. 153, no 2, p. 257-275.
- NILSSON, T.; FERRARI, R.; FACCHETTI, S. Inter-laboratory studies for the validation of solid-phase microextraction for the quantitative analysis of volatile organic compounds in aqueous samples. *Analytica Chimica Acta*, 1997, vol. 356, no 2, p. 113-123.
- NISHIDA, N. [et al.]. Allelopathic effects of volatile monoterpenoids produced by *Salvia leucophylla*: Inhibition of cell proliferation and DNA synthesis in the root apical meristem of *Brassica campestris* seedlings. *Journal of Chemical Ecology*, 2005, vol. 31, p. 1187-1203.
- NOE, S. M. [et al.]. Emissions of monoterpenes linalool and ocimene respond differently to environmental changes due to differences in physico-chemical characteristics. *Atmospheric Environment*, 2006, vol. 40, no 25, p. 4649-4662.
- NOVAK, J. [et al.]. Ratios of *cis*- and *trans*-sabinene hydrate in *Origanum majorana* L. and *Origanum microphyllum* (Benth.) Vogel. *Biochemical Systematics and Ecology*, 2000, vol. 28, no 7, p. 697-704.
- NURZYŃSKA-WIERDAK, R. Essential oil composition of coriander (*Coriandrum sativum* L.) herb depending on the development stage. *Acta Agrobotanica*, 2013, vol. 66, no 1, p. 53-60.
- O'NEILL, M. J. [et al.]. Isolation of trans-lactone-containing triterpenes with thrombin inhibitory activities from the leaves of *Lantana camara*. *Journal of Natural Products*, 1998, vol. 61, p. 1328-1331.
- OBONGOYA, B. O.; WAGAI, S. O.; ODHIAMBO, G. Phytotoxic effect of selected crude plant extracts on soil-borne fungi of common bean. *African Crop Science Journal*, 2010, vol. 18, no 1, p. 15-22.
- OLIVAS-GASTÉLUM, R.; NEVÁREZ-MOORILLÓN, G. V.; GASTÉLUM-FRANCO, M. G. Las pruebas de diferencia en el análisis sensorial de los alimentos. *Tecnociencia Chihuahua*, 2009, vol. 3, p. 1-7.
- OLLERTON, J.; WINFREE, R.; TARRANT, S. How many flowering plants are pollinated by flowers? *Oikos* 2011, vol. 120, p. 321-326.
- OLMEDO, R. [et al.]. Essential oil of *Tagetes filifolia* against the four beetle *Tribolium castaneum* and its relation to acetylcholinesterase activity and lipid peroxidation. *Agriscientia*, 2015, vol. 32, no 2, p. 113-121.

- OLMEDO, R. H. [et al.]. Chemical and sensory stability of fried-salted peanuts flavored with oregano essential oil and olive oil. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2009, vol. 89, no 12, p. 2128-2136.
- OLMEDO, R. H.; NEPOTE, V.; GROSSO, N. R. Preservation of sensory and chemical properties in flavoured cheese prepared with cream cheese base using oregano and rosemary essential oils. *LWT-Food Science and Technology*, 2013, vol. 53, no 2, p. 409-417.
- OMEZ-FLORES, R. [et al.]. Antitumor and immunomodulating potential of *Coriandrum sativum*, *Piper nigrum* and *Cinnamomum zeylanicum*. *Journal of Natural Products*, 2010, vol. 3, p. 54-63.
- ORFILA, E. N.; FARINA, E. L.; NOVARA, L. Lamiaceae. *Aportes Botanicos de Salta-Serie Flora*, 1996, vol. 4, no 2, p. 1-77.
- ORLOVA, I. [et al.]. The small subunit of snapdragon geranyl diphosphate synthase modifies the chain length specificity of tobacco geranylgeranyl diphosphate synthase in planta. *Plant Cell*, 2009, vol. 21, p. 4002-4017.
- ORMEÑO, E. [et al.]. Production and diversity of volatile terpenes from plants on calcareous and siliceous soils: effect of soil nutrients. *Journal of Chemical Ecology*, 2008, vol. 34, no 9, p. 1219-1229.
- ORMEÑO, E.; FERNANDEZ, C.; MÉVY, J. P. Plant coexistence alters terpene emission and content of Mediterranean species. *Phytochemistry*, 2007, vol. 68, no 6, p. 840-852.
- ORMEÑO, E.; GOLDSTEIN, A.; NIINEMETS, Ü. Extracting and trapping biogenic volatile organic compounds stored in plant species. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2011, vol. 30, no 7, p. 978-989
- OSZAGYAN, M. [et al.]. Supercritical fluid extraction of volatile compounds from lavandin and thyme. *Flavour and Fragrance Journal*, 1996, vol. 11, no 3, p. 157-165.
- OTOOM, S. A. [et al.]. The use of medicinal herbs by diabetic Jordanian patients. *Journal of Herbal Pharmacotherapy*, 2006, vol. 6, no 2, p. 31-41.
- OUYANG, G.; VUCKOVIC, D.; PAWLISZYN, J. Nondestructive sampling of living systems using in vivo solid-phase microextraction. *Chemical Reviews*, 2011, vol. 111, no 4, p. 2784-2814.
- OUYANG, Q.; ZHAO, J.; CHEN, Q. Instrumental intelligent test of food sensory quality as mimic of human panel test combining multiple cross-perception sensors and data fusion. *Analytica Chimica Acta*, 2014, vol. 841, p. 68-76.
- OYEDAPO, O. O.; SAB, F. C.; OLAGUNJU, J. A. Bioactivity of fresh leaves of *Lantana camara*. *Biomedical Letters*, 1999, vol. 59, no 233, p. 175-183.
- OYEDEJI, O. A.; EKUNDAYO, O.; KÖNIG, W. A. Volatile leaf oil constituents of *Lantana camara* L from Nigeria. *Flavour and Fragrance Journal*, 2003, vol. 18, no 5, p. 384-386.
- PAARAKH, M. P.; KUMAR, J.; RUPESH, M. Analgesic activity of methanol extract of *Coriandrum sativum* linn fruit. *World Journal Of Pharmacy And Pharmaceutical Sciences*, 2016, vol. 5, no 10, p. 1456-1464.
- PADRÓN MERCADO, C. M.; BARRETO, I. Representaciones sociales asociadas al consumo hedónico de alimentos en restaurantes. *Revista Latinoamericana de Psicología*, 2011, vol. 43, no 3, p. 487-496.
- PALACIO, L. [et al.]. *In Vitro* propagation of “Jarilla” (*Larrea divaricata* CAV.) and secondary metabolite production. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 2008, vol. 31, no 12, p. 2321-2325.

- PALACIOS, S. M. [et al.]. Screening of Argentinian plants for pesticide activity. *Fitoterapia*, 2007, vol. 78, no 7, p. 580-584.
- PANDEY, A. [et al.]. Pharmacological screening of *Coriandrum sativum* Linn. for hepatoprotective activity. *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences*, 2011, vol. 3, no 3, p. 435-441.
- PARDO, C. E.; DEL CAMPO, P. C. Combinación de métodos factoriales y de análisis de conglomerados en R: el paquete FactoClass. *Revista Colombiana de Estadística*, 2007, vol. 30, no 2, p. 231-245.
- PARÉ, P. W.; TUMLINSON, J. H. De novo biosynthesis of volatiles induced by insect herbivory in cotton plants. *Plant Physiology*, 1997, vol. 114, p. 1161-1167.
- PARK, G. [et al.]. *Coriandrum sativum* L. protects human keratinocytes from oxidative stress by regulating oxidative defense systems. *Skin Pharmacology and Physiology*, 2012, vol. 25, no 2, p. 93-99.
- PARK, G. [et al.]. Coriander alleviates 2,4-dinitrochlorobenzene-induced contact dermatitis-like skin lesions in mice. *Journal of Medicinal Food*, 2014, vol. 17, no 8, p. 862-868.
- PARRA, P., CAMERONI, M. Cadenas alimentarias: Hierbas Aromáticas y especias, Dirección de Industria Alimentaria y Agroindustrias SAGPyA. 2009. Disponible en: http://www.alimentosargentinos.gov.ar/03/revistas/r_45/cadenas/Cond_Esp_Aromaticas_especias.htm
- PARTHASARATHI, T.; VELU, G.; JEYAKUMAR, P. Impact of crop heat units on growth and developmental physiology of future crop production: A review. *Research & Reviews: A Journal of Crop Science and Technology*, 2013, vol. 2, no 1, p. 1-11.
- PARTHASARATHY, V. A.; ZACHARIAH, T. J. Coriander. En: *Chemistry of spices*, CAB International Ed., UK, 2008, p. 190-206.
- PASCUAL VILLALOBOS, M. J. Volatile activity of plant essential oils against stored product beetle pests, *Advances in stored product protection. Proceedings of the 8th International Working Conference on Stored Product Protection*, CAB International, Wallingford, UK, 2003, p. 648-650.
- PASTENES, C.; HORTON, P. Effect of high temperature on photosynthesis in beans. 1. Oxygen evolution and chlorophyll fluorescence. *Plant Physiology*, 1996, vol. 112, p. 1245-1251.
- PATEL, D. K. [et al.]. Cardio protective effect of *Coriandrum sativum* L. on isoproterenol induced myocardial necrosis in rats. *Food and Chemical Toxicology*, 2012, vol. 50, no 9, p. 3120-3125.
- PAUL, C.; POHNERT, G. Production and role of volatile halogenated compounds from marine algae. *Natural Products Reports*, 2011, vol. 28, p. 186-195.
- PAUNERO, I. E.; BANDONI, A. L.; VAN BAREN, C. M. Fenología, componentes del rendimiento y calidad del aceite esencial de genotipos de coriandro (*Coriandrum sativum* L.), en el noreste de la provincia de Buenos Aires. *Horticultura Argentina*, 2014, vol. 33, no 82, p. 19-26.
- PAWAR, V. C.; THAKER, V. S. Evaluation of the anti-*Fusarium oxysporum* f. sp *cicer* and anti-*Alternaria porri* effects of some essential oils. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2007, vol. 23, no 8, p. 1099-1106.
- PAWLISZYN, J. Ed. *Handbook of solid phase microextraction*. Elsevier. 2012.

- PAWLISZYN, J. Ed. Applications of solid phase microextraction (Vol. 5). Royal Society of Chemistry. 1999.
- PELLATI, F. [et al.]. Headspace solid-phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry analysis of the volatile compounds of *Evodia* species fruits. *Journal of Chromatography A*, 2005, vol. 1087, no 1, p. 265-273.
- PELLEGRINI, M. C. [et al.]. Anti-quorum sensing and antimicrobial activity of aromatic species from South America. *Journal of Essential Oil Research*, 2014, vol. 26, no 6, p. 458-465.
- PEÑUELAS, J.; LLUSIÀ, J. The complexity of factors driving volatile organic compound emissions by plants. *Biologia Plantarum*, 2001, vol. 44, no 4, p. 481-487.
- PEÑUELAS, J. [et al.]. Linking isoprene with plant thermotolerance, antioxidants and monoterpene emissions. *Plant Cell Environ.* 2005, vol. 28, p. 278-286.
- PÉREZ, R. A. [et al.]. Analysis of volatiles from Spanish honeys by solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2002, vol. 50, no 9, p. 2633-2637.
- PERYAM, D. R.; PILGRIM, F. J. Hedonic scale method of measuring food preferences. *Food Technology*, 1957, vol. 1, no 9, p. 9-14.
- PETRONILHO, S.; COIMBRA, M. A.; ROCHA, S. M. A critical review on extraction techniques and gas chromatography based determination of grapevine derived sesquiterpenes. *Analytica Chimica Acta*, 2014, vol. 846, p. 8-35.
- PHEROBASE. Disponible en: <http://www.pherobase.com/database/kovats/kovats-index.php>
- PICHERSKY, E.; GANG, D. R. Genetics and biochemistry of secondary metabolites in plants: an evolutionary perspective. *Trends in Plant Science*, 2000, vol. 5, no 10, p. 439-445.
- PICHERSKY, E.; GERSHENZON, J. The formation and function of plant volatiles: Perfumes for pollinator attraction and defense. *Current Opinion of Plant Biology*, 2002, vol. 5, p. 237-243.
- PICHERSKY, E.; NOEL, J. P.; DUDAREVA, N. Biosynthesis of plant volatiles: Nature's diversity and ingenuity. *Science*, 2006, vol. 311, p. 808-811.
- PICHERSKY, E. [et al.]. Floral scent production in *Clarkia* (Onagraceae). I. Localization and developmental modulation of monoterpene emission and linalool synthase activity. *Plant Physiology*, 1994, vol. 106, p. 1533-1540.
- PICKL, K. E. [et al.]. Headspace-SPME-GC/MS as a simple cleanup tool for sensitive 2, 6-diisopropylphenol analysis from lipid emulsions and adaptable to other matrices. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2011, vol. 55, no 5, p. 1231-1236.
- PINO, J. A.; ROSADO, A.; FUENTES, V. Chemical composition of the seed oil of *Coriandrum sativum* L. from Cuba. *Journal of Essential Oil Research*, 1996, vol. 8, no 1, p. 97-98.
- PIRIH, F. [et al.]. Adverse effects of hyperlipidemia on bone regeneration and strength. *Journal of Bone and Mineral Research*, 2012, vol. 27, no 2, p. 309-318.

- PORTER, J. R.; DELECOLLE, R. Interaction of temperature with other environmental factors in controlling the development of plants. En: Symposia of the Society for Experimental Biology, 1988, vol. 42, p. 133-156.
- POURMORTAZAVI, S. M.; HAJIMIRSADEGHI, S. S. Supercritical fluid extraction in plant essential and volatile oil analysis. Journal of Chromatography A, 2007, vol. 1163, no 1, p. 2-24.
- PRADHAN, B. K.; BADOLA, H. K. Chemical stimulation of seed germination in ex situ produced seeds in *Swertia chirayita*, a critically endangered medicinal herb. Research Journal of Seed Science, 2010, vol. 3, no 3, p. 139-149.
- PRAKASH, O. [et al.]. Composition of essential oil, concrete, absolute and SPME analysis of *Tagetes patula* capitula. Industrial Crops and Products, 2012, vol. 37, no 1, p. 195-199.
- PRICE, P. W. [et al.]. Interactions among 3 trophic levels-influence of plants on interactions between insect herbivores and natural enemies. Annual Review of Ecology and Systematics, 1980, vol. 11, p. 41-65.
- PRIETO, A. [et al.]. Stir-bar sorptive extraction: a view on method optimisation, novel applications, limitations and potential solutions. Journal of Chromatography A, 2010, vol. 1217, no 16, p. 2642-2666.
- PRIETO, M. [et al.]. Concepto de calidad en la industria agroalimentaria. Interciencia, 2008, vol. 33, no 4, p. 258-264.
- PRINS, C. L.; VIEIRA, I. J.; FREITAS, S. P. Growth regulators and essential oil production. Brazilian Journal of Plant Physiology, 2010, vol. 22, no 2, p. 91-102.
- PROSEN, H.; ZUPANČIČ-KRALJ, L. Solid-phase microextraction. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 1999, vol. 18, no 4, p. 272-282.
- PULIDO, P.; PERELLO, C.; RODRIGUEZ-CONCEPCION, M. New insights into plant isoprenoid metabolism. Molecular Plant, 2012, vol. 5, p. 964-967.
- QADIR, G. [et al.]. Relationship of heat units accumulation and fatty acid composition in sunflower. Pakistan Journal of Agricultural Science, 2007, vol. 44, no 1, p. 24-29.
- QUÍLLEZ, J.; RUIZ, J. A.; ROMERO, M. P. Relationships Between Sensory Flavor Evaluation and Volatile and Nonvolatile Compounds in Commercial Wheat Bread Type Baguette. Journal of Food Science, 2006, vol. 71, no 6, p. 423-427.
- QUIROGA, P. R.; ASENSIO, C. M.; NEPOTE, V. Antioxidant effects of the monoterpenes carvacrol, thymol and sabinene hydrate on chemical and sensory stability of roasted sunflower seeds. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2015, vol. 95, no 3, p. 471-479.
- QUIROGA, P. R. [et al.]. Antioxidant activity of essential oil of oregano species from Argentina in relation to their chemical composition. International Journal of Food Science & Technology, 2011, vol. 46, no 12, p. 2648-2655.
- RAAL, A.; ARAK, E.; ORAV, A. Chemical composition of coriander seed essential oil and their conformity with EP standards. Agraarteadus, 2004, vol. 15, no 4, p. 234-239.

- RAGUSO, R. A. Why do flowers smell? The chemical ecology of fragrancedriven pollination. In: Cardé, R.T., Millar, J.G. (Eds.), *Advances in Insect Chemical Ecology*. Cambridge University Press, Cambridge, UK, 2004, p. 151-178.
- RAGUSO, R. A. Wake up and smell the roses: the ecology and evolution of floral scent. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics*, 2008, vol. 39, p. 549-569.
- RAGUSO, R. A.; PICHERSKY, E. Floral volatiles from *Clarkia breweri* and *C. concinna* (Onagraceae): Recent evolution of floral scent and moth pollination. *Plant Systematics and Evolution*, 1995, vol. 194, p. 55-67.
- RAHMATULLAH, M. [et al.]. Plants prescribed for both preventive and therapeutic purposes by the traditional healers of the Bede community residing by the Turag River, Dhaka district. *American Eurasian Journal of Sustainable Agriculture*, 2011, vol. 5, p. 325-331.
- RAHMATULLAH, M. [et al.]. Folk medicinal uses of Verbenaceae family plants in Bangladesh. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, 2011, vol. 8, no 5S, p. 53-65.
- RAJESHWARI, U.; ANDALLU, B. Medicinal benefits of coriander (*Coriandrum Sativum* L.). *Spatula DD*, 2011, vol. 1, no 1, p. 51-58.
- RAKSHSHANDEH, H.; SADEGHNIA, H. R.; GHORBANI, A. Sleep-prolonging effect of *Coriandrum sativum* hydro-alcoholic extract in mice. *Natural Products Research*, 2012, vol. 26, no 22, p. 2095-2098.
- RAMADAN, M. F.; MÖRSEL, J. T. Oxidative stability of black cumin (*Nigella sativa* L.), coriander (*Coriandrum sativum* L.) and niger (*Guizotia abyssinica* Cass.) crude seed oils upon stripping. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 2004, vol. 106. No 1, p. 35-43.
- RANDRIANALISAONA, J. A. [et al.]. Seasonal and chemotype influences on the chemical composition of *Lantana camara* L.: Essential oils from Madagascar. *Analytica Chimica Acta*, 2005, vol. 545, no 1, p. 46-52.
- RASMANN, S. [et al.]. Recruitment of entomopathogenic nematodes by insect-damaged maize. *Nature*, 2005, vol. 434, p. 732-737.
- REDDY, V.; UROOJ, A.; KUMAR, A. Evaluation of antioxidant activity of some plant extracts and their application in biscuits. *Food Chemistry*, 2005, vol. 90, p. 317-321.
- REHDER, V. L. G. [et al.]. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oil from *Origanum Applii* EO *Vulgare*. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, 2004, vol. 6, p. 67-71.
- REINECCIUS, G. *Flavor chemistry and technology*. Boca Raton, FL, USA: CRC Press. 2006.
- REINHARD, J.; SRIVIVASAN, M. V.; ZHANG, S. Scent-triggered navigation in honeybees. *Nature*, 2004, vol. 427, p. 411-412.
- REUMANN, S. [et al.]. Proteome analysis of Arabidopsis leaf peroxisomes reveals novel targeting peptides, metabolic pathways, and defense mechanisms. *Plant Cell*, 2007, vol. 19, p. 3170-3193.
- REUTER, J. [et al.]. Anti-inflammatory potential of a lipolotion containing coriander oil in the ultraviolet erythema test. *Journal der Dtschen Dermatologischen Gesellschaft*, 2008, vol. 6. No 10, p. 847-851.
- REY-SALGUEIRO, L. [et al.]. Comparative performance of extraction strategies for polycyclic aromatic hydrocarbons in peats. *Journal of Chromatography A*, 2009, vol. 1216. No 27, p. 5235-5241.

- RIELA, S. [et al.]. Effects of solvent-free microwave extraction on the chemical composition of essential oil of *Calamintha nepeta* (L.) Savi compared with the conventional production method. *Journal of Separation Science*, 2008, vol. 31, no 6-7, p. 1110-1117.
- RIMPLER, H.; SAUERBIER, H. Iridoid glucosides as taxonomic markers in the genera *Lantana*, *Lippia*, *Aloysia* and *Phyla*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 1986, vol. 14, no. 3, p. 307-310.
- RO, D. K. [et al.]. Microarray expression profiling and functional characterization of AtTPS genes: Duplicated *Arabidopsis thaliana* sesquiterpene synthase genes At4g13280 and At4g13300 encode root-specific and wound-inducible (Z)- γ -bisabolene synthases. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2006, vol. 448, p. 104-116.
- ROBERTS, D.; BREVARD, H. Isolation and Concentration of Aroma Compounds. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*, 2001, G1.2.1– G1.2.9.
- ROBLES-OZUNA, L. E.; OCHOA-MARTÍNEZ, L. A. Ultrasonido y sus aplicaciones en el procesamiento de alimentos. *Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha*, 2012, vol. 13, no 2, p. 109-122.
- ROCA, W. M.; MROGINSKI, L. A. Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones. *Ciat. Cali, Colombia*. 1991, no 151, 970 p.
- ROCHA, S. [et al.]. Headspace solid phase microextraction (SPME) analysis of flavor compounds in wines. Effect of the matrix volatile composition in the relative response factors in a wine model. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2001, vol. 49, no 11, p. 5142-5151.
- RODRIGUEZ, L. [et al.]. Toxicological evaluation of *Coriandrum sativum* (Cilantro) using *in vivo* and *in vitro* models. *The FASEB Journal*, 2006, vol. 20, p. A645.
- ROERSCH, C.M.; VAN DER HOOGTE, L. Plantas medicinales del surandino del Perú. Apto. 711, Cusco, Perú: Centro de Medicina Andina. 1988.
- ROHDICH, F. [et al.]. The deoxyxylulose phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis: studies on the mechanisms of the reactions catalyzed by IspG and IspH protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, 2003, vol. 100, p. 1586-1591.
- ROJAS, J. [et al.]. Efecto de la proporción de naranja (*Citrus sinensis*), papaya (*Carica papaya*) y piña (*Ananas comosus*) en la aceptabilidad sensorial de un néctar mixto. *Agroindustrial Science*, 2012, vol. 2, no 2, p. 132-138.
- ROMAGNI, J. G.; ALLEN, S. N.; DAYAN, F. E. Allelopathic effects of volatile cineoles on two weedy plant species. *Journal of Chemical Ecology*, 2000, vol. 26, p. 303-313.
- ROMEILAH, R. M.; FAYED, S. A.; MAHMOUD, G. I. Chemical compositions, antiviral and antioxidant activities of seven essential oils. *Journal of Applied Science Research*, 2010, vol. 6, no 1, p. 50-62.
- ROMEU, C.; PINO, J.; MARTÍ, M. P. Algunas consideraciones acerca de la composición química del aceite esencial de *Lantana camara* L. presente en Cuba. *Fitosanidad*, 2004, vol. 8, no 3, p. 59-63.
- RONDON, F. C. [et al.]. *In vitro* effect of *Aloe vera*, *Coriandrum sativum* and *Ricinus communis* fractions on *Leishmania infantum* and on murine monocytic cells. *Veterinary Parasitology*, 2011, vol. 178, no 3, p. 235-240.
- ROSS, I. A. Medicinal plants of the world. Chemical constituents, traditional and modern medical uses. New Jersey: Humana Press. 1999.

- ROTMAN, A. D.; MULGURA DE ROMERO, M. E.; NOVARA, L. Verbenaceae. Aportes Botanicos de Salta-Serie Flora, 1999, vol. 5. No 11, p. 1-83.
- ROUQUAUD, E.; VIDELA, M. E. Oréganos de Mendoza (Argentina). Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias. 2000, vol. XXXIII, no I, p. 23-32.
- ROUSEFF, R. L.; CADWALLADER, K. R. Ed. Headspace Analysis of Foods and Flavors: Theory and Practice; [Proceedings of the American Chemical Society, Held August 23-27, 1998, in Boston, Massachusetts]. Springer Science & Business Media, 2001.
- ROUT, P. K. [et al.]. Composition of essential oil, concrete, absolute, wax and headspace volatiles of *Murraya paniculata* (Linn.) Jack flowers. Flavour and Fragrance Journal, 2007, vol. 22, no 5, p. 352-357.
- RUBIOLO, P. [et al.]. Essential oils and volatiles: sample preparation and analysis. A review. Flavour and Fragrance Journal, 2010, vol. 25, no 5, p. 282-290.
- RUBLUO, A. [et al.]. Strategies for the recovery of endangered orchids and cacti through in-vitro culture. Biological Conservation, 1993, vol. 63, no 2, p. 163-169.
- RUTHER, J.; KLEIER, S. Plant-plant signaling: Ethylene synergizes volatile emission in *Zea mays* induced by exposure to (Z)-3-hexen-1-ol. Journal Chemical Ecology, 2005, vol. 31, p. 2217-2222.
- SAEED, S.; TARIQ, P. Antimicrobial activities of *Emblica officinalis* and *Coriandrum sativum* against gram positive bacteria and *Candida albicans*. Pakistan Journal of Botany, 2007, vol. 39, no 3, p. 913-917.
- SAGAR, L.; SEHGAL, R.; OJHA, S. Evaluation of antimotility effect of *Lantana camara* L. var. *acuelata* constituents on neostigmine induced gastrointestinal transit in mice. BMC Complementary and Alternative Medicine, 2005, vol. 5, no 1-18, p. 1-6.
- ŞAHİN, F. [et al.]. Biological activities of the essential oils and methanol extract of *Origanum vulgare* ssp. *vulgare* in the Eastern Anatolia region of Turkey. Food Control, 2004, vol. 15, no 7, p. 549-557.
- SAKSENA, N.; TRIPATHI, H. H. S. Plant volatiles in relation to fungistasis. Fitoterapia, 1985, vol. 56, p. 243-244.
- SALEH, M. [et al.]. Antibacterial triterpenoids isolated from *Lantana camara*. Pharmaceutical Biology, 1999, vol. 37, no 1, p. 63-66.
- SALVAT, A. [et al.]. Antimicrobial activity in methanolic extracts of several plant species from northern Argentina. Phytomedicine, 2004, vol. 11, no 2-3, p. 230-234.
- SAMOJLIK, I. [et al.]. Antioxidant and hepatoprotective potential of essential oils of coriander (*Coriandrum sativum* L.) and caraway (*Carum carvi* L.) (Apiaceae). Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2010, vol. 58, no 15, p. 8848-8853.
- SÁNCHEZ-CHIANG, N.; JIMÉNEZ, V. M. Técnicas de conservación in vitro para el establecimiento de bancos de germoplasma en cultivos tropicales. Agronomía Mesoamericana, 2010, vol. 21, no 1, p. 193-205.
- SANCHO, J. B.; DE CASTRO, J. J. Introducción al análisis sensorial de los alimentos. Alfaomega Grupo Editor SA, México. 2002.

- SANTORO, G. F. [et al.]. Effect of oregano (*Origanum vulgare* L.) and thyme (*Thymus vulgaris* L.) essential oils on *Trypanosoma cruzi* (Protozoa: Kinetoplastida) growth and ultrastructure. *Parasitology Research*, 2007, vol. 100, no 4, p. 783-790.
- SARIKURKCU, C. [et al.]. Composition, antioxidant, antimicrobial and enzyme inhibition activities of two *Origanum vulgare* subspecies (subsp. *vulgare* and subsp. *hirtum*) essential oils. *Industrial Crops and Products*, 2015, vol. 70, p. 178-184.
- SATHISH, R.; VYAWAHARE, B.; NATARAJAN, K. Antiulcerogenic activity of *Lantana camara* leaves on gastric and duodenal ulcers in experimental rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 2011, vol. 134, no 1, p. 195-197.
- SAULO, M. S. [et al.]. Cytotoxic and genotoxic effects of two medicinal species of Verbenaceae. *Caryologia*, 2009, vol. 62, no 4, p. 326-333.
- SAXENA, R. C.; DIXIT, O. P.; HARSHAN, V. Insecticidal action of *Lantana camara* against *Callosobruchus chinensis* (Coleoptera: Bruchidae). *Journal of Stored Products Research*, 1992, vol. 28, no 4, p. 279-281.
- SCHENK, R. U.; HILDEBRANDT, A. C. Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. *Canadian Journal of Botany*, 1972, vol. 50, no 1, p. 199-204.
- SCHMELZ, E. A.; ALBORN, H. T.; TUMLINSON, J. H. The influence of intact-plant and excised-leaf bioassay designs on volicitin- and jasmonic acid-induced sesquiterpene volatile release in *Zea mays*. *Planta*, 2001, vol. 214, p. 171-179.
- SCHNEE, C. [et al.]. The products of a single maize sesquiterpene synthase form a volatile defense signal that attracts natural enemies of maize herbivores. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, 2006, vol. 103, p. 1129-1134.
- SEN, S. Pharmacognostic and anti-hyperglycemic evaluation of *Lantana camara* (L.) var. *aculeate* leaves in alloxan-induced hyperglycemic rats. *International Journal of Research in Pharmaceutical Sciences*, 2016, vol. 1, no 3, p. 247-252.
- SENA FILHO, J. [et al.]. A chemical marker proposal for the *Lantana* genus: composition of the essential oils from the leaves of *Lantana radula* and *L. canescens*. *Natural Product Communications*, 2010, vol. 5, no 4, p. 635-640.
- SENA FILHO, J. G. [et al.]. Phenylethanoid and lignan glycosides from polar extracts of *Lantana*, a genus of verbenaceous plants widely used in traditional herbal therapies. *Journal of Natural Products*, 2009, vol. 72, no 7, p. 1344-1347.
- SENA FILHO, J. G. [et al.]. Chemical and molecular characterization of fifteen species from the *Lantana* (Verbenaceae) genus. *Biochemical Systematics and Ecology*, 2012, vol. 45, p. 130-137.
- SENATORE, F. [et al.]. Antibacterial activity of *Tagetes minuta* L.(Asteraceae) essential oil with different chemical composition. *Flavour and Fragrance Journal*, 2004, vol. 19, no 6, p. 574-578.
- SERRATO CRUZ, M. A. Aspectos del cultivo de dos especies de *Tagetes* productoras de aceites esenciales. *Naturaleza y Desarrollo*, 2003, vol. 1, no 1, p. 15-22.

- SERRATO CRUZ, M. A.; BARAJAS PÉREZ, J. S. Wild populations of *Tagetes filifolia* Lag. from central-southern Mexico. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 2006, vol. 29, p. 7-12.
- SERRATO-CRUZ, M. Á.; DÍAZ-CEDILLO, F.; BARAJAS-PÉREZ, J. S. Composición del aceite esencial en germoplasma de *Tagetes filifolia* Lag. de la Región centro-sur de México. *Agrociencia*, 2008, vol. 42, no 3, p. 277-285.
- SHA, Y. [et al.]. Development of single-drop microextraction and simultaneous derivatization followed by GC-MS for the determination of aliphatic amines in tobacco. *Journal of Separation Science*, 2010, vol. 33, no 9, p. 1283-1287.
- SHAHZADI, I. [et al.]. Evaluating biological activities of the seed extracts from *Tagetes minuta* L. found in Northern Pakistan. *Journal of Medicinal Plants Research*, 2010, vol. 4, no 20, p. 2108-2112.
- SHARKEY, T. D.; CHEN, X. Y.; YEH, S. Isoprene increases thermotolerance of fosmidomycin-fed leaves. *Plant Physiology*, 2001, vol. 125, p. 2001-2006.
- SHARMA, K.; NIWAS, R.; SINGH, M. Heat use efficiency of wheat cultivars under different sowing dates. *Haryana Agricultural University Journal of Research*, 2003, vol. 33, p. 103-106.
- SHARMA, M.; SHARMA, P. D.; BANSAL, M. P. Lantadenes and their esters as potential antitumor agents. *Journal of Natural Products*, 2008, vol. 71, no 7, p. 1222-1227.
- SHARMA, O. P.; DAWRA, R. K.; MAKKAR, H. P. Toxicity of isolated *Lantana* (*Lantana camara* L) constituents to male and female guinea pigs. *Veterinary and Human Toxicology*, 1989, vol. 31, no 1, p. 10-13.
- SHARMA, O. P.; DAWRA, R. K.; MAKKAR, H. P. S. Isolation and partial purification of lantana (*Lantana camara* L.) toxins. *Toxicology Letters*, 1987, vol. 37, no 2, p. 165-172.
- SHARMA, O. P. [et al.]. Biological action of lantadene C, a new hepatotoxicant from *Lantana camara* var. *aculeata*. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 1992, vol. 7, no 2, p. 73-79.
- SHEEHAN, E. M. [et al.]. Time-weighted average SPME analysis for in planta determination of cVOCs. *Environmental Science & Technology*, 2012, vol. 46, no 6, p. 3319-3325.
- SHIRAZI, M. T. [et al.]. Chemical composition, antioxidant, antimicrobial and cytotoxic activities of *Tagetes minuta* and *Ocimum basilicum* essential oils. *Food Science & Nutrition*, 2014, vol. 2, no 2, p. 146-155.
- SHULAEV, V.; SILVERMAN, P.; RASKIN, I. Airborne signalling by methyl salicylate in plant pathogen resistance. *Nature*, 1997, vol. 385, p. 718-721.
- SILVA, C. [et al.]. Microextraction by packed sorbent (meps) and solid-phase microextraction (spme) as sample preparation procedures for the metabolomic profiling of urine. *Metabolites*, 2014, vol. 4, no 1, p. 71-97.
- SILVA, C. [et al.]. Microextraction by packed sorbent (meps) and solid-phase microextraction (spme) as sample preparation procedures for the metabolomic profiling of urine. *Metabolites*, 2014, vol. 4, no 1, p. 71-97.
- SILVA, F. [et al.]. Antifungal activity of *Coriandrum sativum* essential oil, its mode of action against *Candida* species and potential synergism with amphotericin B. *Phytomedicine*, 2011a, vol. 19, no 1, p. 42-47.
- SILVA, F. [et al.]. Coriander (*Coriandrum sativum* L.) essential oil: its antibacterial activity and mode of action evaluated by flow cytometry. *Journal of Medical Microbiology*, 2011b, vol. 60, no 10, p. 1479-1486.

- SILVA, P. S. [et al.]. Chemical composition of the essential oil and hexanic fraction of *Lippia* and *Lantana* species. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 2010, vol. 20, no 6, p. 843-849.
- SIMKIN, A. J. [et al.]. Peroxisomal localisation of the final steps of the mevalonic acid pathway in planta. *Planta*, 2011, vol. 234, p. 903-914.
- SIMKIN, A. J. [et al.]. The tomato carotenoid cleavage dioxygenase 1 genes contribute to the formation of the flavor volatiles b-ionone, pseudoionone, and geranylacetone. *Plant Journal*, 2004, vol. 40, p. 882-892.
- SINGH, B.; SOOD, R. P.; SINGH, V. Chemical composition of *Tagetes minuta* L. oil from Himachal Pradesh (India). *Journal of Essential Oil Research*, 1992, vol. 4, no 5, p. 525-526.
- SINGH, G. [et al.]. Studies on essential oils, Part 41, Chemical composition, antifungal, antioxidant and sprout suppressant activities of coriander (*Coriandrum sativum*) essential oil and its oleoresin. *Flavour and Fragrance Journal*, 2006, vol. 21, p. 472-479.
- SINGH, H. P. [et al.]. Comparative phytotoxicity of four monoterpenes against *Cassia occidentalis*. *Annals of Applied Biology*, 2002, vol. 141, p. 111-116.
- SKANDAMIS, P. N.; NYCHAS, G. J. Effect of oregano essential oil on microbiological and physic-chemical attributes of minced meat stored in air and modified atmospheres. *Journal of Applied Microbiology*, 2001, vol. 91, no 6, p. 1011-1022.
- SLIWINSKA, M. [et al.]. Food analysis using artificial senses. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2014, vol. 62, p. 1423-1448.
- SMALLFIELD, B. Coriander, Crop & Food Research, New Zealand Institute for Crop & Food Research, 2001, no 4. Disponible en: <http://www.crop.cri.nz/home/products-services/publications/broadsheets/030coriander>
- SMALLFIELD, B. M. [et al.]. Effects of postharvest treatments on yield and composition of coriander herb oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1994, vol. 42, no 2, p. 354-359.
- SOARES, B. V. [et al.]. Antifungal activity, toxicity and chemical composition of the essential oil of *Coriandrum sativum* L. fruits. *Molecules*, 2012, vol. 17, p. 8439-8448.
- SÖKMEN, M. [et al.]. *In vitro* antioxidant, antimicrobial, and antiviral activities of the essential oil and various extracts from herbal parts and callus cultures of *Origanum acutidens*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2004, vol. 52, no 11, p. 3309-3312.
- SONIBARE, O. O.; EFFIONG, I. Antibacterial activity and cytotoxicity of essential oil of *Lantana camara* L. leaves from Nigeria. *African Journal of Biotechnology*, 2008, vol. 7, no 15, p. 2618-2620.
- SORIA, E. A. [et al.]. Antioxidant activity of different extracts of Argentinian medicinal plants against arsenic-induced toxicity in renal cells. *Human & Experimental Toxicology*, 2008, vol. 27, no 4, p. 341-346.
- SORIA, E. A. [et al.]. Development of an antioxidant phytoextract of *Lantana grisebachii* with lymphoprotective activity against *in vitro* arsenic toxicity. *Advances in Pharmacological Sciences*, 2014, vol. 2014, p. 1-7.
- SOUSA, E. O. [et al.]. Chemical Composition of Essential Oil of *Lantana camara* L. (Verbenaceae) and Synergistic Effect of the Aminoglycosides Gentamicin and Amikacin. *Records of Natural Products*, 2012, vol. 6, no 2, p. 144-50.

- SOUSA, E. O. [et al.]. Atividade antibacteriana e interferência de *Lantana camara* L. e *Lantana montevidensis* (Spreng.) Briq. na resistência de aminoglicosídeos. *Revista Brasileira de Biociências*, 2011, vol. 9, no 1, p. 1-5.
- SOUSA, E. O.; COSTA, J. G. Genus *Lantana*: chemical aspects and biological activities. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 2012, vol. 22, no 5, p. 1115-1180.
- SOUSA, E. O. [et al.]. Chemical composition and resistance-modifying effect of the essential oil of *Lantana camara* Linn. *Pharmacognosy Magazine*, 2010, vol. 6, no 22, p. 79-83.
- SOUZA, E. L. [et al.]. Effectiveness of *Origanum vulgare* L. essential oil to inhibit the growth of food spoiling yeasts. *Food Control*, 2007, vol. 18, no 5, p. 409-413.
- SOUZA-SILVA, É. A.; PAWLISZYN, J. Recent advances in solid-phase microextraction for contaminant analysis in food matrices. *Comprehensive Analytical Chemistry*, 2017, vol. 76, p. 483-517.
- SREELATHA, S.; INBAVALLI, R. Antioxidant, Antihyperglycemic, and Antihyperlipidemic Effects of *Coriandrum sativum* Leaf and Stem in Alloxan-Induced Diabetic Rats. *Journal of Food Science*, 2012, vol. 77, no 7, p. 1-5.
- SRIVASTAVA, P. [et al.]. Accumulation of betulinic, oleanolic, and ursolic acids in in vitro cell cultures of *Lantana camara* L. and their significant cytotoxic effects on HeLa cell lines. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 2010, vol. 15, no 6, p. 1038-1046.
- STASHENKO, E. E.; JARAMILLO, B. E.; MARTÍNEZ, J. R. Comparación de la composición química y de la actividad antioxidante in vitro de los metabolitos secundarios volátiles de plantas de la familia Verbenaceae. *Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*, 2003, vol. 27, no 105, p. 579-597.
- STASHENKO, E. E.; JARAMILLO, B. E.; MARTÍNEZ, J. R. Comparison of different extraction methods for the analysis of volatile secondary metabolites of *Lippia alba* (Mill.) NE Brown, grown in Colombia, and evaluation of its in vitro antioxidant activity. *Journal of Chromatography A*, 2004, vol. 1025, no 1, p. 93-103.
- STEEGHS, M. [et al.]. Proton-transfer-reaction mass spectrometry (PTR-MS) as a new tool for real time analysis of root-secreted volatile organic compounds (VOCs) in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology*, 2004, vol. 135, p. 47-58.
- STEICHEN, R. J. Modified solution approach for the gas chromatographic determination of residual monomers by head-space analysis. *Analytical Chemistry*, 1976, vol. 48, no 9, p. 1398-1402.
- STOJKOVIĆ, D. [et al.]. Investigation on antibacterial synergism of *Origanum vulgare* and *Thymus vulgaris* essential oils. *Archives of Biological Sciences*, 2013, vol. 65, no 2, p. 639-643.
- STUPPNER, H.; GANZERA, M. Determination of safrole in different *Asarum* species by headspace gas chromatography. *Chromatographia*, 1998, vol. 47, no 11, p. 685-688.
- SUDHA, K. [et al.]. Study of antidepressant like effect of *Coriandrum sativum* and involvement of monoaminergic and GABAergic system. *International Journal of Research in Ayurveda and Pharmacy*, 2011, vol. 2, p. 267-270.
- SUGIMOTO, K. [et al.]. Intake and transformation to a glycoside of (Z)-3-hexenol from infested neighbors reveals a mode of plant odor reception and defense. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, 2014, vol. 111, no 19, p. 7144-7149.

- SÜLSEN, V. [et al.]. *In vitro* evaluation of trypanocidal activity in plants used in Argentine traditional medicine. *Parasitology Research*, 2006, vol. 98, no 4, p. 370-374.
- SUMAN, S.; MEHTA, P. K. Bioefficacy of plant extracts against cabbage aphid. *Research on Crops*, 2009a, vol. 10, no 1, p. 98-100.
- SUMAN, S.; MEHTA, P. K. Evaluation of plant extracts on the larval weight, pupation and adult emergence activities of cabbage butterfly. *Research on Crops*, 2009b, vol. 10, no 1, p. 94-97.
- SUNDUFU, A. J.; SHOUSHAN, H. Chemical composition of the essential oils of *Lantana camara* L. occurring in south China. *Flavour and Fragrance Journal*, 2004, vol. 19, no 3, p. 229-232.
- SUNESSON, A. L. [et al.]. Thermal desorption cold trap-injection in high-resolution gas chromatography: multivariate optimization of experimental conditions. *Journal of Chromatography A*, 1992, vol. 623, no 1, p. 93-103.
- TAKABAYASHI, J.; DICKE, M. Plant-carnivore mutualism through herbivore-induced carnivore attractants. *Trends in Plant Science*, 1996, vol. 1, p. 109-113.
- TANG, E. L. [et al.]. Antioxidant activity of *Coriandrum sativum* and protection against DNA damage and cancer cell migration. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 2013, vol. 13, no 1, p. 347-360.
- TANKEU, S. Y. [et al.]. Essential oil variation of *Tagetes minuta* in South Africa—A chemometric approach. *Biochemical Systematics and Ecology*, 2013, vol. 51, p. 320-327.
- TANKIEWICZ, M.; MORRISON, C.; BIZIUK, M. Application and optimization of headspace solid-phase microextraction (HS-SPME) coupled with gas chromatography–flame-ionization detector (GC–FID) to determine products of the petroleum industry in aqueous samples. *Microchemical Journal*, 2013, vol. 108, p. 117-123.
- TATEO, F.; BONONI, M. Headspace-SPME analysis of volatiles from quince whole fruits. *Journal of Essential Oil Research*, 2010, vol. 22, no 5, p. 416-418.
- TAVARIA, F. K. [et al.]. Amino acid catabolism and generation of volatiles by lactic acid bacteria. *Journal of Dairy Science*, 2002, vol. 85, p. 2462-2470.
- TEIXEIRA, B. [et al.]. Chemical composition and bioactivity of different oregano (*Origanum vulgare*) extracts and essential oil. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2013, vol. 93, no 11, p. 2707-2714.
- TELICI, I.; GUL, T. O.; SAHBAZ, N. Yield, essential oil content and composition of *Coriandrum sativum* varieties (var. *vulgare* Alef and var. *microcarpum* DC.) grown in two different locations. *Journal of Essential Oil Research*, 2006, vol. 18, p. 189-193.
- TENG, H.; LEE, W. Y. Antibacterial and antioxidant activities and chemical compositions of volatile oils extracted from *Schisandra chinensis* Baill. seeds using simultaneous distillation extraction method, and comparison with Soxhlet and microwave-assisted extraction. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2014, vol. 78, no 1, p. 79-85.
- TEPE, B.; CILKIZ, M. A pharmacological and phytochemical overview on *Satureja*. *Pharmaceutical Biology*, 2016, vol. 54, no 3, p. 375-412.

- TEVES, M. R. [et al.]. Records of medicinal plants utilized as gastroprotective and for treatment of gastrointestinal ulcers, gastritis, and heartburn in Argentina: a survey of the literature. *Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants*, 2015, vol. 21, no 4, p. 333-371.
- TEWARI, S. K.; SINGH, M. Yielding ability of wheat (*Triticum aestivum*) at different dates of sowing a temperature-dependent performance. *Indian Journal of Agronomy*, 1993, vol. 38, no 2, p. 204-209.
- THAPPA, R. K. [et al.]. Changes in chemical composition of *Tagetes minuta* oil at various stages of flowering and fruiting. *Journal of Essential Oil Research*, 1993, vol. 5, no 4, p. 375-379.
- THOLL, D. [et al.]. Practical approaches to plant volatile analysis. *The Plant Journal*, 2006, vol. 45, no 4, p. 540-560.
- THOLL, D. [et al.]. Two sesquiterpene synthases are responsible for the complex mixture of sesquiterpenes emitted from *Arabidopsis* flowers. *The Plant Journal*, 2005, vol. 42, no 5, p. 757-771.
- THOLL, D. [et al.]. The biochemistry of homoterpenes - common constituents of floral and herbivore-induced plant volatile bouquets. *Phytochemistry*, 2011, vol. 72, p. 1635-1646.
- TIEMAN, D. M. [et al.]. Tomato aromatic amino acid decarboxylases participate in synthesis of the flavor volatiles 2-phenylethanol and 2-phenylacetaldehyde. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, 2006, vol. 103, p. 8287-8292.
- TIWARI, R. S.; AGARWAL, A.; SENGAR, S. C. Effect of dates of sowing and number of cuttings on growth, seed yield and economics of coriander cv. Pant Haritima. *Crop Research (Hisar)*, 2002, vol. 23, no 2, p. 324-329.
- TOKARNIA, C. H. [et al.]. Complementary studies on the toxicity of *Lantana camara* (Verbenaceae) in cattle. *Pesquisa Veterinaria Brasileira*, 1999, vol. 19, no 3-4, p. 128-132.
- TOLOZA, A. C. [et al.]. Bioactivity of Argentinean essential oils against permethrin-resistant head lice, *Pediculus humanus capitis*. *Journal of Insect Science*, 2010, vol. 10, no 185, p. 1-8.
- TOMITAKA, Y.; ATSUKIYO, K.; ARISA, N. Effect of daylength on the flower bud differentiation and development in coriander (*Coriandrum sativum* L.). *Journal of Agricultural Science, Tokyo Nogyo Daigaku*, 2001, vol. 46, no 3, p. 193-200.
- TORRES, L. E. [et al.]. Field evaluation of twelve clones of oregano grown in the main production areas of Argentina: identification of quantitative trait with the highest discriminant value. *ISRN Agronomy*, 2012, vol. 2012, p. 1-10.
- TORRES, L. E. [et al.]. Evaluation of the agronomic performance and taxonomic characterization of four clones of oregano (*Origanum* sp.). *Molecular Medicinal Chemistry*, 2010, vol. 21, p. 91-93.
- TRIPATHI, A. K. [et al.]. Toxicity, feeding deterrence, and effect of activity of 1,8-cineole from *Artemisia annua* on progeny production of *Tribolium castaneum* (Coleoptera:Tenebrionidae). *Journal of Economic Entomology*, 2001, vol. 94, p. 979-983.
- TSUJI, M. [et al.]. Microwave-assisted synthesis of metallic nanostructures in solution. *Chemistry-A European Journal*, 2005, vol. 11, no 2, p. 440-452.

- TUREK, C.; STINTZING, F. C. Stability of essential oils: a review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2012, vol. 12, p. 40-53.
- TURLINGS, T. C. J.; HILTPOLD, I.; RASMANN, S. The importance of root-produced volatiles as foraging cues for entomopathogenic nematodes. *Plant Soil*, 2012, vol. 358, p. 51-60.
- TURLINGS, T. C. J. [et al.]. Timing of induced volatile emissions in maize seedlings. *Planta*, 1998, vol. 207, p. 146-152.
- UBAID, J. M.; KADHIM, M. J.; HAMEED, I. H. Study of bioactive methanolic extract of *Camponotus fellah* using Gas Chromatography–Mass Spectrum. *International Journal of Current Pharmaceutical Review and Research*, 2017, vol. 8, no 6, p. 434-439.
- UCHIBAYASHI, M. The coriander story. *Yakushigaku Zasshi*, 2001, vol. 36, no 1, p. 56-70.
- UPADHYAY, R. K. Essential oils: anti-microbial, antihelminthic, antiviral, anticancer and antiinsect properties. *Journal of Applied Biosciences*, 2010, vol. 36, p. 1-22.
- VACHERON, J. [et al.]. Plant growth-promoting rhizobacteria and root system functioning. *Frontiers in Plant Science*, 2013, vol. 4, no 356, p. 1-19.
- VALADEU, C. [et al.]. Medicinal plants from the Yanesha (Peru): evaluation of the leishmanicidal and antimalarial activity of selected extracts. *Journal of Ethnopharmacology*, 2009, vol. 123, no 3, p. 413-422.
- VAN BAREN, C. V. [et al.]. Triterpenic acids and flavonoids from *Satureja parvifolia*. Evaluation of their antiprotozoal activity. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 2006, vol. 61, no 3-4, p. 189-192.
- VAN DER PUTTEN, W. H. [et al.]. Linking above- and belowground multitrophic interactions of plants, herbivores, pathogens, and their antagonists. *Trends in Ecology & Evolution*, 2001, vol. 16, p. 547-554.
- VAN TOL, R. W. [et al.]. Plants protect their roots by alerting the enemies of grubs. *Ecology Letters*, 2001, vol. 4, no 4, p. 292-294.
- VANCANNEYT, G. [et al.]. Hydroperoxide lyase depletion in transgenic potato plants leads to an increase in aphid performance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, 2001, vol. 98, p. 8139-8144.
- VANDENDRIESSCHE, T.; NICOLAI, B. M.; HERTOOG, M. L. Optimization of HS SPME Fast GC-MS for High-throughput analysis of strawberry aroma. *Food Analytical Methods*, 2013, vol. 6, no 2, p. 512-520.
- VASSAO, D. G. [et al.]. Chavicol formation in sweet basil (*Ocimum basilicum*): cleavage of an esterified C9 hydroxyl group with NAD(P)H-dependent reduction. *Organic and Biomolecular Chemistry*, 2006, vol. 4, p. 2733-2744.
- VASUDEVAN, P.; KASHYAP, S.; SHARMA, S. *Tagetes*: a multipurpose plant. *Bioresource Technology*, 1997, vol. 62, no 1-2, p. 29-35.
- VÁZQUEZ-ARAÚJO, L. [et al.]. Use of hydrodistillation and headspace solid-phase microextraction to characterize the volatile composition of different hop cultivars. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2013, vol. 93, no 10, p. 2568-2574.
- VEKARIA, R. H. [et al.]. Evaluation of neuroprotective effect of *Coriandrum sativum* Linn. against ischemic-reperfusion insult in brain. *International Journal of Phytopharmacology*, 2012, vol. 3, no 2, p. 186-193.

- VELÁZQUEZ, D. Clave para los géneros de Lamiaceae en Venezuela. *Acta Botanica Venezuelica*, 1997, p. 1-42.
- VENKATACHALAM, T. [et al.]. Antidiabetic activity of *Lantana camara* Linn fruits in normal and streptozotocin-induced diabetic rats. *Journal of Pharmacy Research*, 2011, vol. 4, no 5, p. 1550-1552.
- VERDEGUER, M.; BLÁZQUEZ, M. A.; BOIRA, H. Phytotoxic effects of *Lantana camara*, *Eucalyptus camaldulensis* and *Eriocephalus africanus* essential oils in weeds of Mediterranean summer crops. *Biochemical Systematics and Ecology*, 2009, vol. 37, no 4, p. 362-369.
- VERMA, R. K.; VERMA, S. K. Phytochemical and termiticidal study of *Lantana camara* var. *aculeata* leaves. *Fitoterapia*, 2006, vol. 77, no 6, p. 466-468.
- VILLALOBOS, V. M.; THORPE, T. A. Micropropagación: conceptos, metodología y resultados. *Cultivo de Tejidos en la Agricultura*, 1991, p. 127-141.
- VILLARREAL, Q. J. A. Familia Compositae. Tribu Tageteae. Flora del Bajío y de Regiones Adyacentes. Fascículo 113. Instituto de Ecología A. C. Pátzcuaro, Michoacán. México. 2003.
- VILLARROEL, L.; ALVAREZ, J.; MALDONADO, D. Aplicación del análisis de componentes principales en el desarrollo de productos. *Acta Nova, Revista de Ciencia y Tecnología*, 2003, p. 399-410.
- VITURRO, C. I. [et al.]. Evaluación de la composición de los aceites esenciales de *Satureja boliviana*, *S. odora* y *S. parvifolia*, obtenidos de colectas en Tucumán, Argentina. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 2007, vol. 6, no 5, p. 288-289.
- VUORINEN, T. [et al.]. Emission of *Plutella xylostella*-induced compounds from cabbages grown at elevated CO₂ and orientation behavior of the natural enemies. *Plant Physiology*, 2004, vol. 135, p. 1984-1992.
- WALDEN, A. B.; HABER, W. A.; SETZER, W. N. Essential oil compositions of three *Lantana* species from Monteverde, Costa Rica. *Natural Product Communications*, 2009, vol. 4, no 1, p. 105-108.
- WANG, Z. [et al.]. An absorbing microwave micro-solid-phase extraction device used in non-polar solvent microwave-assisted extraction for the determination of organophosphorus pesticides. *Analytica Chimica Acta*, 2013, vol. 760, p. 60-68.
- WANGENSTEEN, H.; SAMUELSEN, A. B.; MALTERUD, K. E. Antioxidant activity in extracts from coriander. *Food Chemistry*, 2004, vol. 88, no 2, p. 293-297.
- WANZALA, W.; OGOMA, S. B. Chemical composition and mosquito repellency of essential oil of *Tagetes minuta* from the Southern slopes of Mount Elgon in Western Kenya. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 2013, vol. 16, no 2, p. 216-232.
- WARD, J. L. [et al.]. Metabolomic analysis of *Arabidopsis* reveals hemiterpenoid glycosides as products of a nitrate ion-regulated, carbon flux overflow. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, 2011, vol. 108, p. 10762-10767.
- WATTS, B. M. [et al.]. Métodos sensoriales básicos para la evaluación de alimentos. Centro Internacional de Investigaciones para el desarrollo. Ottawa. Canadá. 1992.

- WEI, L. S. [et al.]. Review on Plant Extracts as Natural Antibacterial Agent. Universiti Malaysia Terengganu Kuala Terengganu, 2008, p 1-6.
- WEI, S. [et al.]. Ultrasonic nebulization extraction-heating gas flow transfer-headspace single drop microextraction of essential oil from pericarp of *Zanthoxylum bungeanum* Maxim. Journal of Chromatography A, 2011, vol. 1218, no 29, p. 4599-4605.
- WERCINSKI, S. A. Ed. Solid phase microextraction: a practical guide. CRC Press. 1999.
- WESOŁOWSKA, A.; JADCZAK, D. Composition of the Essential Oils from Inflorescences, Leaves and Stems of *Ocimum basilicum* 'Cinnamon' Cultivated in North-western Poland. Journal of Essential Oil Bearing Plants, 2016, vol. 19, no 4, p. 1037-1042.
- WESTON, L. A.; RYAN, P. R.; WATT, M. Mechanisms for cellular transport and release of allelochemicals from plant roots into the rhizosphere. Journal of experimental botany, Journal of Experimental Botany, 2012, vol. 63, p. 3445-3454.
- WIDHALM, J. R. [et al.]. Rethinking how volatiles are released from plant cells. Trends in plant science, 2015, vol. 20, no 9, p. 545-550.
- WINTERHALTER, P.; ROUSEFF, R. Carotenoid-derived aroma compounds: an introduction. In: Winterhalter P, Rouseff R, eds. Carotenoid-derived aroma compounds. Washington, DC, USA: American Chemical Society, 2001, p. 1-17.
- WISE, M. L.; CROTEAU, R. Monoterpene biosynthesis. In: Cane DD, ed. Comprehensive natural products chemistry: isoprenoids including carotenoids and steroids. Amsterdam, the Netherlands. Elsevier, 1999, p. 97-153.
- WITTIG DE PENNA, E. Evaluación sensorial: una metodología actual para tecnología de alimentos. Facultad de Ciencias Básicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile. Chile. 2001.
- WITTIG DE PENNA, E. [et al.]. Caracterización sensorial y química de la calidad de té (*Thea sinensis*) consumidos en Chile. ALAN, 2005, vol. 55, no 1, p. 1-7.
- WONG, S. W. [et al.]. Characterising the release of flavour compounds from chewing gum through HS-SPME analysis and mathematical modelling. Food Chemistry, 2009, vol. 114, no 3, p. 852-858.
- WRIGHT, G. A.; CHOUDHARY, A. F.; BENTLEY, M. A. Reward quality influences the development of learned olfactory biases in honeybees. Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences, 2009, vol. 276, p. 2597-2604.
- WRIGHT, G. A. [et al.]. Intensity and the ratios of compounds in the scent of snapdragon flowers affect scent discrimination by honeybees (*Apis mellifera*). Journal of Comparative Physiology. A Neuroethology Sensory, Neural and Behavioral Physiology, 2005, vol. 191, p. 105-114.
- WU, S. [et al.]. Redirection of cytosolic or plastidic isoprenoid precursors elevates terpene production in plants. Nature Biotechnology, 2006, vol. 24, p. 1441-1447.
- WU, T. T. [et al.]. Extracts from the aerial part of *Coriandrum sativum* has anti-inflammatory properties. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2010, vol. 90, no 11, p. 1846-1854.

- XU, Y. [et al.]. Headspace solid-phase microextraction (HS-SPME) coupled with gas chromatography-mass spectrometric (GC-MS) analysis of volatile profiles during the stir-frying process of malt. *Analytical Methods*, 2016, vol. 8, no 7, p. 1699-1704.
- YAN, Y. [et al.]. Applications of liquid-phase microextraction techniques in natural product analysis: a review. *Journal of Chromatography A*, 2014, vol. 1368, p. 1-17.
- YANG, C.; WANG, J.; LI, D. Microextraction techniques for the determination of volatile and semivolatile organic compounds from plants: a review. *Analytica Chimica Acta*, 2013, vol. 799, p. 8-22.
- YANG, J. [et al.]. Extraction of the volatile and semivolatile compounds in seeds of *Cuminum cyminum* L. using hydrodistillation followed by Headspace-Ionic liquid-based single-drop microextraction. *Chromatographia*, 2012, vol. 75, no 23-24, p. 1435-1443.
- ZAIDI, S. F. [et al.]. Anti-inflammatory and cytoprotective effects of selected Pakistani medicinal plants in *Helicobacter pylori*-infected gastric epithelial cells. *Journal of Ethnopharmacology*, 2012, vol. 141, no 1, p. 403-410.
- ZAICA, L. L. Spices and herbs: their antimicrobial activity and its determination. *Journal of Food Safety*, 1988, vol. 9, p. 97-118.
- ZANOUSI, M. B. P.; NEKOEI, M.; MOHAMMADHOSSEINI, M. Composition of the essential oils and volatile fractions of *Artemisia absinthium* by three different extraction methods: Hydrodistillation, solvent-free microwave extraction and headspace solid-phase microextraction combined with a novel QSRR evaluation. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 2016, vol. 19, no 7, p. 1561-1581.
- ZARGAR-NATTAJ, S. S. [et al.]. The effect of *Coriandrum sativum* seed extract on the learning of newborn mice by electric shock: interaction with caffeine and diazepam. *Psychology Research and Behavior Management*, 2011, vol. 4, p. 13-19.
- ZHANG, C. [et al.]. Analysis of the volatile compounds in *Ligusticum chuanxiong* Hort. using HS-SPME-GC-MS. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2007, vol. 44, no 2, p. 464-470.
- ZHANG, Q.; PENG, S.; ZHANG, Y. Allelopathic potential of reproductive organs of exotic weed *Lantana camara*. *Allelopathy Journal*, 2009, vol. 23, no 1, p. 213-220.
- ZHANG, X. L. [et al.]. Phenolic compounds from *Origanum vulgare* and their antioxidant and antiviral activities. *Food Chemistry*, 2014, vol. 152, p. 300-306.
- ZHELJAZKOV, V. D. [et al.]. Cultivar and sowing date effects on seed yield and oil composition of coriander in Atlantic Canada. *Industrial Crops and Products*, 2008, vol. 28, no 1, p. 88-94.
- ZHU, F.; CHEN, G. Applications of In Vivo and In Vitro Solid-Phase Microextraction Techniques in Plant Analysis. En: *Solid Phase Microextraction*. Springer Berlin Heidelberg, 2017, p. 247-285.
- ZHU, F. [et al.]. Applications of in vivo and in vitro solid-phase microextraction techniques in plant analysis: a review. *Analytica Chimica Acta*, 2013, vol. 794, p. 1-14.
- ZOUBIRI, S.; BAALIOUAMER, A. Essential oil composition of *Coriandrum sativum* seed cultivated in Algeria as food grains protectant. *Food Chemistry*, 2010, vol. 122, p. 1226-1228.

ZULOAGA, F. O.; MORRONE, O.; BELGRANO, M. J. Catálogo de las plantas vasculares del Cono Sur (Argentina, Sur de Brasil, Chile, Paraguay y Uruguay). Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden 107: i-xcvi + 1-3348. 2008. Disponible en: <http://www.darwin.edu.ar/Proyectos/FloraArgentina/fa.htm>.

ZUNINO, M. P.; ZYGADLO, J. A. Changes in the composition of phospholipid fatty acids and sterols of maize root in response to monoterpenes. *Journal of Chemical Ecology*, 2005, vol. 31, p. 1269-1283.

ZYGADLO, J. A. [et al.]. Essential oil variation in *Tagetes minuta* populations. *Biochemical Systematics and Ecology*, 1990, vol. 18, no 6, p. 405-407.

ZYGADLO, J. A.; GUZMAN, C. A.; GROSSO, N. R. Antifungal properties of the leaf oils of *Tagetes minuta* L. and *T. filifolia* Lag. *Journal of Essential Oil Research*, 1994, vol. 6, no 6, p. 617-621.

ZYGADLO, J. A. [et al.]. Composition of the inflorescence oils of some *Tagetes* species from Argentina. *Journal of Essential Oil Research*, 1993, vol. 5, no 6, p. 679-681.

ZYGADLO, J. A. [et al.]. The Essential Oils of *Satureja odora* and *S. parvifolia* from Argentina. *Journal of Essential Oil Research*, 1993, vol. 5, no 5, p. 549-551.